

**Substrat induzierte Radikalbildung in dem Eisen-Schwefel-  
Flavoenzym 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus  
*Clostridium aminobutyricum***

**Dissertation**

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Irfan Çinkaya**

aus Afyon/Türkei

Marburg/Lahn 2002

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 1996 bis April 2000 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Buckel durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 07.06.2002 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. W. Buckel  
Zweitgutachter: Prof. Dr. R. Thauer

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2002

*für Kevser*

Die im Rahmen dieser Dissertation erzielten Ergebnisse sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Müh, U., Çinkaya, I., Albracht, S.P.J. & Buckel, W. (1996) 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase from *Clostridium aminobutyricum*: Characterization of FAD and iron-sulfur clusters involved in an overall non-redox reaction. *Biochemistry* 35, 11710-11718.

Çinkaya, I., Buckel, W., Medina, M., Gomez-Moreno, C. & Cammack, R (1997) ENDOR investigation of 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase from *Clostridium aminobutyricum*: Comparison with other flavin radical enzymes. *Biol. Chem.* 378, 843-849.

Buckel, W. Çinkaya, I., Dickert, S., Eikmanns, A., Gerhardt, A., Hans, M., Liesert, M., Thamer, W. & Pierik, A.J. (1999) One and two electron redox cycles in flavin-dependent dehydrations. *Proceedings of the 13<sup>th</sup> International Symposium on Flavins and Flavoproteins*, Konstanz, Germany, p31-40.

Çinkaya, I., Buckel, W. & Link, T.A. (2002). The redox properties of FAD and iron-sulfur clusters in 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase studied by direct electrochemistry, *in Bearbeitung*

Çinkaya, I., Pierik, A.J., Bill, E. & Buckel, W. (2002). Substrate induced radical formation in 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase, *in Bearbeitung*

# INHALTSVERZEICHNIS

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>1 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Anaerober Abbau von 4-Aminobutyrat durch <i>C. aminobutyricum</i> .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Eisen-Schwefel-Zentren in Proteinen .....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Flavine in Proteinen .....</b>	<b>12</b>
<b>2.4 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus <i>Clostridium aminobutyricum</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>2.5 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>18</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Verwendetes Material .....</b>	<b>19</b>
3.1.1 Chemikalien .....	19
3.1.2 Biochemikalien und Enzyme .....	19
3.1.3 Gase .....	19
3.1.4 Säulenmaterialien und Fertigsäulen .....	19
3.1.5 Geräte .....	20
<b>3.2 Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>21</b>
3.2.1 Verwendete Bakterien .....	21
3.2.2 Kulturmedium und Fermentation im 100 l Fermenter .....	21
<b>3.3 Biochemische Methoden .....</b>	<b>23</b>
3.3.1 Präparation der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus <i>C. aminobutyricum</i> .....	23
3.3.1.1 Herstellung von Zellextrakten .....	23
3.3.1.2 Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sepharose FF .....	24
3.3.1.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose .....	24
3.3.2 Enzymtests .....	25
3.3.2.1 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase-Test .....	25
3.3.2.2 Vinylacetyl-CoA-Isomerase-Test .....	25
3.3.2.3 Enzymtest zur Konzentrationsbestimmung von CoA-Derivaten .....	25
3.3.3 UV-Vis Stopped-flow Analysen .....	26
3.3.4 Protein Kristallisation .....	27
<b>3.4 Analytische Methoden .....</b>	<b>27</b>
3.4.1 Proteinbestimmung .....	27
3.4.2 Mikro-Biuret Methode mit TCA-DOC Fällung .....	27
3.4.2.1 Pierce-BCA-Macro-Assay .....	28
3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	29

3.4.4	UV-Vis spektroskopische Konzentrationsbestimmung von FAD .....	30
3.4.5	HPLC-Analyse von Flavinderivaten .....	30
3.4.6	Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen .....	30
3.4.6.1	Eisen Bestimmung mit Ferrospectral .....	30
3.4.6.2	Eisen Bestimmung mit Ferene .....	31
3.4.7	Bestimmung von säurelabilem Schwefel .....	32
3.4.8	Iodometrische Eichung einer Na <sub>2</sub> S -Lösung .....	33
3.4.9	Eichung einer Natriumdithionit-Lösung .....	33
3.4.10	Photoreduktion mit 5-Deazaflavin .....	35
3.4.11	HPLC-Analyse von CoA-Derivaten .....	35
<b>3.5</b>	<b>Spektroskopische Methoden .....</b>	<b>35</b>
3.5.1	EPR-Spektroskopie .....	35
3.5.2	ENDOR-Spektroskopie .....	38
3.5.3	Mössbauer-Spektroskopie .....	38
<b>3.6</b>	<b>Elektrochemische Methoden.....</b>	<b>39</b>
3.6.1	Redox titrationen.....	40
3.6.1.1	Redox titration verfolgt mittels EPR-Spektroskopie.....	40
3.6.1.2	Redox titration verfolgt mittels CD-Spektroskopie .....	41
3.6.2	Cyclovoltammetrie .....	44
<b>3.7</b>	<b>Synthesen .....</b>	<b>47</b>
3.7.1	Synthese von Fettsäure-CoA-Derivaten .....	47
3.7.2	Synthese von 4-Hydroxy[3- <sup>2</sup> H]butyrat.....	48
3.7.3	Synthese von 4-Hydroxy[2- <sup>2</sup> H]butyrat.....	49
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Zusammensetzung und spektroskopische Eigenschaften der Kofaktoren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase.....</b>	<b>50</b>
4.1.1	Gehalt an Eisen, FAD und Bestimmung der spezifischen Aktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase .....	50
4.1.2	Elektronenaufnahmekapazität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase .....	53
4.1.3	Charakterisierung der [4Fe-4S] <sup>1+</sup> -Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mittels EPR-Spektroskopie.....	59
4.1.4	Nachweis von [2Fe-2S]-Zentren nach Inaktivierung mit Luftsauerstoff .....	61
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der Redoxeigenschaften der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase.....</b>	<b>64</b>
4.2.1	Redox titration der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase.....	64
4.2.2	Cyclovoltammetrie der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase .....	67
<b>4.3</b>	<b>4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Substrat.....</b>	<b>74</b>
4.3.1	Modulation der Redoxeigenschaften der Kofaktoren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase durch Substrat.....	74
4.3.2	Dehydrogenase-Aktivität in der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase?.....	79
4.3.3	Bestimmung der Dissoziationskonstanten für Crotonyl-CoA und CoASH an aktiver als auch O <sub>2</sub> -inaktivierter Dehydratase.....	81
4.3.4	EPR-spektroskopischer Nachweis der Substrat-induzierten FAD-Semichinonbildung in der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase.....	85

4.3.5 Stopped-flow Analysen der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit verschiedenen Substraten verfolgt mittels UV-Vis Spektroskopie .....	87
4.3.5.1 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase plus Crotonyl-CoA .....	87
4.3.5.2 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase plus 4-Hydroxybutyryl-CoA .....	89
4.3.5.3 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit 4-Hydroxy[2- <sup>2</sup> H]butyryl-CoA und 4-Hydroxy[3- <sup>2</sup> H]butyryl-CoA .....	90
4.3.6 Substrat induzierte Radikalbildung in der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Dichlorophenolindophenol .....	92
4.3.7 ENDOR-Spektren des FAD-Semichinon der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit und ohne Substrat .....	95
4.3.8 Hochfrequenz-EPR Analysen (140GHz) der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Crotonyl-CoA .....	99
4.3.9 Charakterisierung der [4Fe-4S] <sup>1+</sup> -Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Crotonyl-CoA mittels EPR- und Mössbauer-Spektroskopie .....	100
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>106</b>
<b>5.1 Struktur und Zusammensetzung der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase .....</b>	<b>106</b>
<b>5.2 Modulation der thermodynamischen Eigenschaften des FAD und der [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratase nach Substrat-Bindung .....</b>	<b>108</b>
<b>5.3 Identifizierung radikalischer Intermediate nach Substrat Zugabe .....</b>	<b>114</b>
<b>5.4 Die Funktion von FAD und [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentren in einem hypothetischen Reaktionsmechanismus .....</b>	<b>115</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>116</b>

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

CD	Circular dichroismus
CV	Cyclische Voltammetrie
DCPIP	Dichlorophenolindophenol
EPR	Elektronen Paramagnetische Resonanz
ENDOR	Elektronen Kern Doppelresonanz
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
OTTLE	Optisch transparente Dünnschichtelektrode
SHE	Standard Wasserstoffelektrode
UV-Vis	Ultraviolett Visible



## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Enzym 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nimmt in der Fermentation von 4-Aminobutyrat zu Acetat, Butyrat und Ammoniak durch *Clostridium aminobutyricum* eine Schlüsselposition ein. Es katalysiert die Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA und die Isomerisierung von Vinylacetyl-CoA zu Crotonyl-CoA. Die Dehydratisierung ist eine ungewöhnliche Reaktion von besonderem mechanistischen Interesse, da ein nicht azides Proton mit einem  $pK_s > 30$  am  $\beta$ -C-Atom des 4-Hydroxybutyryl-CoA abstrahiert werden muss. Im Unterschied zu den  $\alpha$ -2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen, die auch ein nicht azides Proton abspalten müssen, wird für diese Katalyse kein weiteres Aktivatorprotein oder eine zusätzliche Elektronenquelle benötigt. Obwohl die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase FAD und Eisen-Schwefel-Zentren enthält und nur im oxidierten Zustand ( $FAD_{bq}$ ) aktiv ist, katalysiert sie insgesamt keine Redoxreaktion.

Der Gehalt an FAD und  $[4Fe-4S]$ -Zentren wurde eingehend untersucht und neu bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass nur durch eine strikt anaerobe und schonende Reinigungsprozedur der maximale Gehalt an Kofaktoren erhalten werden kann. Die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase enthält im nativen Zustand ein  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentrum und ein FAD pro Untereinheit. Jedoch weist der Großteil der Präparationen einen geringeren Anteil an Kofaktoren auf, so dass eine Analyse des Kofaktorgehalts von jeder Präparation notwendig ist, um spektroskopische Daten quantitativ auszuwerten. Es wurden Hinweise gefunden, dass die Zerstörung der  $4Fe-4S]^{2+}$ -Zentren durch Sauerstoff über die Bildung von  $[2Fe-2S]$ -Zentren verläuft. Des Weiteren wurde eine Ablösung des FAD nach Sauerstoff-Exposition beobachtet, außerdem war das Enzym danach nicht mehr in der Lage, die FAD-Semichinon Form zu stabilisieren. Das neutrale FAD-Semichinon wurde mittels EPR- und ENDOR-Spektroskopie auf molekularer Ebene charakterisiert. Über das EPR-Relaxationsverhalten des FAD-Semichinons wurden Hinweise für eine Nachbarschaft (10-15 Å) zum  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentrum gefunden. Das  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentrum konnte zum großen Teil reduziert werden und war damit für eine EPR-spektroskopische Charakterisierung zugänglich. Die Reduktion mit Natriumdithionit bzw. Photoreduktion in Gegenwart von Substrat führte zur Identifizierung von  $[4Fe-4S]^{1+}$ -Zentren mit einem Spinzusand  $S = 3/2$ , wohingegen ohne Substrat ein Elektronenspin von  $S = 1/2$  beobachtet wurde.

Die Redoxeigenschaften der [4Fe-4S]-Zentren und des FAD wurden mit verschiedenen Methoden in An- und Abwesenheit von Substrat näher charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Redoxpotentiale für das FAD und der [4Fe-4S]-Zentren in Gegenwart von Substrat um bis zu +200 mV erhöht werden. Für die bislang als nicht reduzierbar geltenden [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentren der Dehydratase konnte in Gegenwart von Substrat ein Redoxpotential von – 414 mV bestimmt werden.

Mittels EPR-Spektroskopie konnten erstmals Hinweise zur Bildung eines FAD-Semichinons nach Substrat-Zugabe beobachtet werden. Dieser Befund stützt den postulierten Ketyl-Mechanismus für die Dehydratase. In diesem Mechanismus wird das FAD zum Semichinon reduziert und das Substrat zu einem Ketyl-Radikal oxidiert. Des weiteren wurden andere Substrat induzierte Radikale in sehr geringeren Konzentrationen nachgewiesen, die jedoch keiner bekannten Spezies zugeordnet werden konnten. Das FAD-Semichinon Radikal wurde mittels 140GHz-EPR-Spektroskopie und <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektroskopie im Detail analysiert. Es wurden keine Hinweise auf eine quantitative Bildung eines Substratradikals gefunden.

Die Inkubation der Dehydratase mit Substrat in Gegenwart des Oxidationsmittel Dichlorophenolindophenol (+219 mV) führte dazu, dass nahezu das gesamte FAD in die Semichinon-Form überführt wurde. Über eine bathochromatische Verschiebung des UV-Vis Spektrums von DCPIP konnte die Bindung am Enzym gezeigt werden. In elektrochemischen Versuchen konnte in Gegenwart von Substrat ein ähnliches Phänomen beobachtet werden. Die elektrochemische Oxidation des FAD-Semichinons in Gegenwart von Substrat-Überschuß führte zu einem kontinuierlichen Stromfluss, der nur durch einen stetigen Elektronentransfer vom Enzym zur Elektrode erklärt werden kann. Demnach wurde das durch Substrat generierte FAD-Semichinon von der Elektrode oxidiert. Diese „Katalyse“ an der Elektrode könnte einer Dehydrogenase-Aktivität mit der Bildung des Intermediates 4-Hydroxycrotonyl-CoA entsprechen.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Anaerober Abbau von 4-Aminobutyrat durch *C. aminobutyricum*

Die Gattung der Clostridien setzt sich aus sporenbildenden und nicht-sporenbildenden anaeroben Eubakterien zusammen. Aufgrund von 16S rRNA-Sequenzanalysen konnte die phylogenetische Heterogenität dieser Gattung nachgewiesen werden, so dass eine Unterteilung in 19 Untergruppen erforderlich war<sup>1</sup>. Eine Besonderheit der Clostridien ist die Fermentation von Aminosäuren. Die Endprodukte dieser Fermentationen sind Acetat, kurzkettige Fettsäuren, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> und H<sub>2</sub>.

Für die gut untersuchte anaerobe Glutamat-Fermentation sind verschiedene Stoffwechselwege beschrieben worden, wobei der Methylaspartat-Weg in Bodenbakterien und der Hydroxyglutarat-Weg in Säugern lebenden Bakterien zu den wichtigsten zählen<sup>2</sup>. In beiden Fällen werden Acetat und Butyrat gebildet. Ein dritter Abbauweg wird postuliert, in dem Enzyme aus dem Mesaconat-Weg und der Propionat-Bildung aus Succinat beteiligt sind. Hier wird neben Acetat Propionat gebildet. Glutamat kann auch zu 4-Aminobutyrat decarboxyliert werden. Die Besonderheit, 4-Aminobutyrat zu fermentieren, ist bisher nur für *Clostridium aminobutyricum* und drei weiteren Bakterienarten beschrieben worden<sup>4-6</sup>. 4-Aminobutyrat wird auch in eukaryontischen Zellen gebildet und dient als Neurotransmitter (GABA)<sup>3</sup>.

*C. aminobutyricum* fermentiert 4-Aminobutyrat nach folgender Gleichung um, wobei 1 ATP gebildet wird<sup>7</sup>:



Der Fermentationsweg in *Clostridium aminobutyricum* wurde bereits 1963 aufgeklärt<sup>8</sup> und durch die Arbeiten von Willadsen & Buckel mit der Identifizierung des Schlüsselenzyms 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase bestätigt (Abbildung 1).

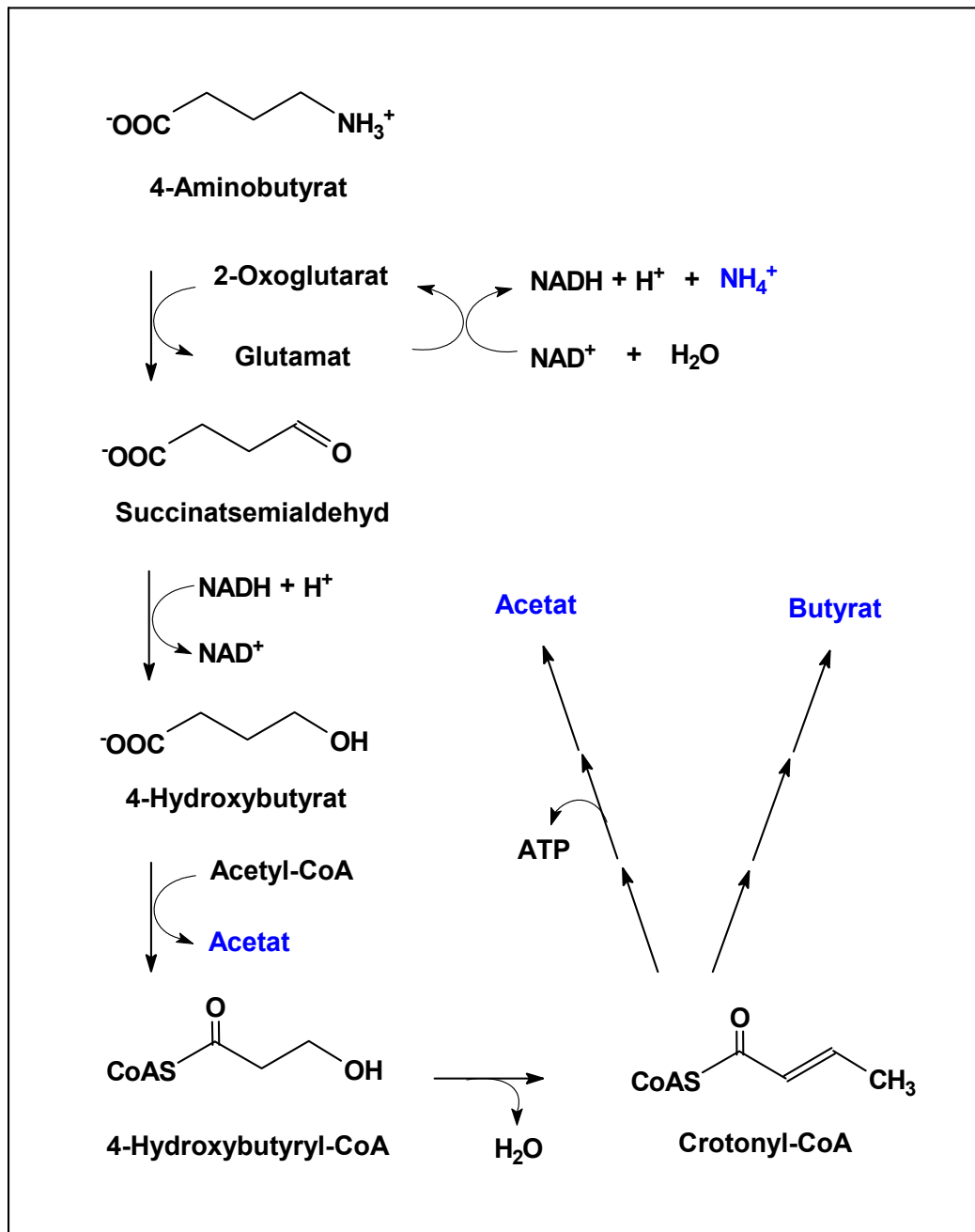


Abbildung 1: Postulierte Fermentation von 4-Aminobutyrat durch *C. aminobutyricum*<sup>8-10</sup>

4-Aminobutyrat wird zunächst zu Succinatsemialdehyd und Glutamat transaminiert, welches mit  $\text{NAD}^+$  zu 2-Oxoglutarat reoxidiert wird. Succinatsemialdehyd wird im folgenden zu 4-Hydroxybutyrat reduziert und mit Acetyl-CoA unter der Katalyse der 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase zu 4-Hydroxybutyryl-CoA aktiviert. Die Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA führt zu Crotonyl-CoA, welches im weiteren zu Acetat und Butyrat disproportioniert wird.

Eine direkte Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA wurde in früheren Untersuchungen nicht angenommen, da diese Reaktion scheinbar viel einfacher über eine Dehydratisierung zu Vinylacetyl-CoA mit anschließender Isomerisierung zu Crotonyl-CoA ablaufen kann<sup>8</sup>. Aerob aufgeschlossener Zellextrakt zeigte keine 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase- aber geringe Isomerase-Aktivität<sup>9</sup>. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass eine direkte Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA möglich ist<sup>11</sup>. Interessanterweise konnte für dasselbe Enzym eine Vinylacetyl-CoA-Isomerase Aktivität nachgewiesen werden; die Isolation eines Vinylacetyl-CoA-Intermediates dagegen blieb aus.

Die reversible Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA ist von besonderem mechanistischen Interesse, da sie die Abstrahierung eines der beiden nicht-aktivierten Protonen am  $\beta$ -Kohlenstoff mit einem pK-Wert größer 30 erfordert. Dieses mechanistische Problem wird bei einer Vielzahl von anderen, zumeist anaeroben Hydro-Lyasen beobachtet, die bei verschiedenen Fermentationen gebildet werden<sup>12</sup>. In diesem Zusammenhang sind die vergleichbaren Enzyme (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *Acidaminococcus fermentans* und *Clostridium symbiosum*<sup>13,14</sup>, (*R*)-Phenyllactat-CoA-Dehydratase aus *Clostridium sporogenes*<sup>15</sup> und (*R*)-Lactyl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium propionicum*<sup>16,17</sup> zu nennen, die ebenfalls ein nichtaktiviertes Proton von ihrem Substrat entfernen müssen. In jüngster Zeit wurden weitere Hydro-Lyasen identifiziert und z.T. isoliert, die ein vergleichbares mechanistisches Problem darstellen. Für diese Gruppe von "ungewöhnlichen" Dehydratasen wurden Reaktionsmechanismen mit Kohlenstoff basierenden Radikalzwischenstufen (Ketylen) postuliert<sup>18,19</sup>. Für all diese Enzyme, bis auf die Phenyllactat-CoA-Dehydratase, wurden Eisen-Schwefel-Zentren und Flavine als prosthetische Gruppen identifiziert. Für die Phenyllactat-CoA-Dehydratase konnte kein Flavin nachgewiesen werden wie ursprünglich angenommen.

## 2.2 Eisen-Schwefel-Zentren in Proteinen

Anorganische Eisen-Schwefel Komplexe, wie sie z.B. in Mineralien wie Pyrit vorkommen, könnten Prozesse zur Entstehung des Lebens katalysiert haben. Das Vorhandensein von Eisen und Schwefel in großen Mengen als auch das Fehlen von molekularem Sauerstoff in der Uratmosphäre veranlasste Günter Wächtershäuser zu der Hypothese vom „chemoautotrophen Ursprung des Lebens“<sup>20,21</sup>. Diese Hypothese geht davon aus, dass der Ursprung des „Lebens“ in einer anoxischen heißen

Umgebung stattgefunden haben muss. Die Reaktion von FeS mit H<sub>2</sub>S-Gas soll zur Bildung von Pyrit (FeS) und molekularen Wasserstoff geführt haben. Heutzutage sind eine Vielzahl von Proteinen bekannt, die Eisen-Schwefel-Zentren als prosthetische Gruppen aufweisen<sup>22</sup>. Da diese Gebilde zumeist aus einer Ballung von Eisen- und Schwefelatomen bestehen, spricht man auch von Eisen-Schwefel Clustern. Interessanterweise kommen diese Strukturen oft in Enzymen der sehr früh in der Erdgeschichte entstanden Organismen vor. Insbesondere durch die EPR-spektroskopischen Arbeiten von Helmut Beinert konnten die vielfältigen Eisen-Schwefel Strukturen in Proteinen charakterisiert werden<sup>23-25</sup>.

Die EPR-Spektroskopie ermöglicht die Detektion von ungepaarten Elektronen. Im Gegensatz zu einzelnen Elektronen in p-Orbitalen, wie sie in freien Radikalen vorkommen, weisen Übergangsmetallionen und ihre Komplexe von Metallzentren mehrere ungepaarte Elektronen auf, deren Spins bei starkem elektrischen Kristallfeld maximal gepaart (Spinzustand: low-spin) oder bei schwachem Kristallfeld maximal ungepaart (Spinzustand: high-spin) sein können. Aufgrund der ausgeprägten Spin-Bahn-Wechselwirkung bei Metallzentren mit einzelnen Elektronen in d-Orbitalen sind häufig unterschiedliche g-Faktoren vorhanden, die als Identitätsmerkmal verwendet werden. Das EPR-Spektrum eines paramagnetischen Metallkomplexes kann Informationen zum Zustand der Elektronenspins des betreffenden Metalls durch die starke g-Faktor Anisotropie liefern. So sind für eine Reihe verschiedenster Eisen-Schwefel-Zentren EPR-Spektren mit charakteristischen g-Werten bekannt. Zumeist handelt es sich hierbei um rhombische- oder axiale EPR-Signale. Die Detektion eines isotropen, axialen oder rhombischen g-Faktors sowie eventuell eine zusätzlich vorhandene Super-Hyperfeinstruktur, erlaubt Aussagen über die Struktur des Metallkomplexes im Protein. Zudem können die Identität des Metalls und der Liganden als auch die Spindichte am Metallatom und der Liganden ermittelt werden. In manchen Fällen erfordert dies den Einsatz von EPR-Spektrometern mit besonders großen Magneten, die oft zu einer verbesserten Auflösung des EPR-Spektrums führen (Q-Band, W-Band), oder spezieller Techniken wie die des ENDOR (Electron-Nuclear-Double-Resonance) oder ESEEM (EPR-Spin-Echo-Envelope-Modulation). Während ENDOR ein kombiniertes EPR/NMR-Experiment darstellt, wird bei ESEEM mit Mikrowellenimpulsen und schnellen Detektionstechniken gearbeitet. Die erhaltenen zeitabhängigen Signale werden erst durch Fourier-Transformation in Frequenzspektren umgewandelt, aus denen dann die Super-Hyperfeinstruktur-Kopplungen ermittelt werden können. Eine verbesserte Auflösung bedeutet in den meisten Fällen die

Detektion von Super-Hyperfeinstrukturen, deren Kenntnis wichtige Informationen zum Radikalzentrum liefert.

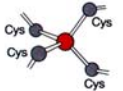
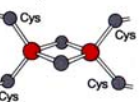
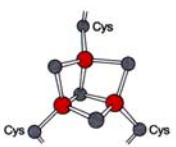
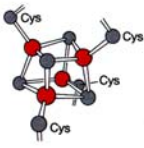
Eine wichtige und ergänzende Methode zur Charakterisierung von Eisen-Schwefel-Zentren stellt die Mössbauer-Spektroskopie dar. Hierbei wird der sogenannte Mössbauer-Effekt genutzt, um das Eisen und seine unmittelbare Umgebung zu charakterisieren.  $^{57}\text{Co}$  wird als Strahlenquelle genutzt. Dieses Isotop zerfällt mit einer Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 270$  Tagen zu einem angeregten Zustand des  $^{57}\text{Fe}$ , dessen Übergang in den Grundzustand führt zu einer  $\gamma$ -Quant Emission. Dieses Photon kann nun von einem anderen  $^{57}\text{Fe}$ -Kern (z.B. zu analysierende Probe) im Grundzustand absorbiert werden. Die Emission des  $\gamma$ -Quant führt zu einem Rückstoß des  $^{57}\text{Fe}$ -Kerns der Strahlenquelle, die dem Kern eine Geschwindigkeit von 100 m/s verleiht. Dieser Vorgang würde aufgrund des Doppler-Effektes normalerweise zu einer Unschärfe der Energiequelle und damit auch der Resonanz führen, da eine Frequenzverschiebung die Folge wäre. Im Mössbauer-Experiment wird diesem Phänomen entgegengewirkt, indem die  $^{57}\text{Co}$ -Quelle in einem Kristallgitter angeordnet ist. Die durch den Rückstoßimpuls freiwerdende Energie wird durch das Kristallgitter aufgenommen. Das führt zu einer extrem kleinen Rückstoßgeschwindigkeit und somit zu einer sehr kleinen Verbreiterung. Die Emission kann also praktisch als rückstoßfrei bezeichnet werden. Aufgrund des beschriebenen Resonanzphänomens muss die Probe bei einer tiefen Temperatur, möglichst nahe am absoluten Nullpunkt, analysiert werden. Im Experiment wird die Energie des emittierten Photons über den Doppler-Effekt kontrolliert, indem die Strahlenquelle mit einer variablen Frequenz bewegt wird. Geschwindigkeiten im Bereich von mm/s sind ausreichend für die Detektion von Absorptionssignalen bei Eisen-Schwefel-Zentren. Mittels der Isomerieverschiebung  $\delta$  kann der Oxidationszustand des Eisen ermittelt werden, während die Quadrupolaufspaltung  $\Delta E_Q$  Auskunft über die Symmetrie der Elektronenverteilung in unmittelbarer Nähe des Eisens gibt.

Durch Interpretation der EPR-Spektren und in darauffolgenden Jahren durch die Anwendung der Mössbauer-Spektroskopie an Eisen-Schwefel Proteinen konnten und können immer noch viele Eisen-Schwefel Proteine auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Seit den 80er Jahren wurden die bis dahin erhaltenen spektroskopischen Daten durch die Röntgenstrukturanalyse vieler Eisen-Schwefel Proteine bestätigt und erlaubten zudem die Entdeckung weiterer Cluster-Typen. Ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis von Eisen-Schwefel-Zentren wurde durch die Synthese und spektroskopische Charakterisierung von Modellkomplexen ermöglicht<sup>26</sup>.

Eine Auswahl der am meisten vorkommenden Eisen-Schwefel-Zentren in Proteinen und ihre spektroskopisch charakteristischen Parameter sind in Abbildung 2 dargestellt.

Die einfachste Struktur stellt das Rubredoxin dar, das keinerlei säurelabilen Schwefel enthält und indem das Fe-Atom von vier Cysteinen koordiniert ist, aber trotzdem zu den Eisen-Schwefel Proteinen gezählt wird. In *Pseudomonas oleovorans* konnte die Funktion des Elektronenüberträgers in der  $\omega$ -Hydroxylierung von Fettsäuren gezeigt werden<sup>27</sup>.

Desweiteren sind die sogenannten Ferredoxine als „klassische“ FeS-Proteine bekannt geworden. Ferredoxine sind Proteine mit einer Elektronenübertragungsfunktion, die ausschließlich mit Eisen-Schwefel-Zentren ermöglicht wird (NCIUB, Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry). Die Besonderheit von Eisen-Schwefel-Proteinen mit Elektronentransfer Eigenschaften ist ihr grosser Potentialbereich von maximal 1 V bei dem Elektronentransfer erfolgen kann<sup>28</sup>.

Protein	Cluster		Oxidations- zustand	formale Wertig- keit	EPR g-Werte (Temp.)	Mößbauer- Isomeriever- schiebung [mm s <sup>-1</sup> ]	$\lambda_{\max}$ [nm], Extinktionskoeffizient ( $\times 10^{-3}$ , pro Fe)
Rubredoxin	1Fe-OS		oxidiert	Fe <sup>3+</sup>	4.3, 9 (< 20 K)	0.25	390(10.8), 490(8.8)
			reduziert	Fe <sup>2+</sup>	keine	0.65	310(10.8), 335(6.3)
2Fe-Ferredoxin	2Fe-2S		oxidiert	2Fe <sup>3+</sup>	keine	0.26	325(6.4), 420(4.8), 465(4.9)
			reduziert	1Fe <sup>3+</sup> , 1Fe <sup>2+</sup>	1.89, 1.95, 2.05 (< 100 K)	0.25, 0.55	Absorption geht bei der Reduktion um 50 % zurück
3Fe-Ferredoxin	2Fe-4S		oxidiert	3Fe <sup>3+</sup>	1.97, 2.00, 2.02 (< 20 K)	0.27	305(7.7), 415(5.2), 455(4.4)
			reduziert	2Fe <sup>3+</sup> , 1Fe <sup>2+</sup>	keine	0.30, 0.46	425(3.2)
4Fe-Ferredoxin	4Fe-4S		oxidiert	3Fe <sup>3+</sup> , 1Fe <sup>2+</sup>	2.04, 2.04, 2.12 (< 100 K)	0.31	325(8.1), 385(5.0), 450(4.6)
			Zwischen- form	2Fe <sup>3+</sup> , 2Fe <sup>2+</sup>	keine	0.42	305(4.9), 390(3.8)
			reduziert	1Fe <sup>3+</sup> , 3Fe <sup>2+</sup>	1.88, 1.92, 2.06 (< 20 K)	0.57	uncharakteristisch; Absorp- tion bricht bei der Reduktion zusammen

**Abbildung 2: Strukturen bekannter Eisen-Schwefel-Zentren und ihre spektroskopischen Charakteristika** (aus „Bioanorganische Chemie“).

Die sogenannten "Pflanzen-Ferredoxine" mit ihren [2Fe-2S]-Zentren werden über vier Cystein-Liganden im Protein aufgespannt und sind ausschließlich an Einelektronen-Transfer Prozessen beteiligt. Eine besondere Gruppe von [2Fe-2S]-Proteinen stellen die Proteine mit "Rieske"-Zentren dar. Hier sind zwei der vier das



Zentrum koordinierenden Cysteinreste durch Histidinliganden ersetzt. Mit Ausnahme der beiden "Rieske"-Zentren von *Sulfolobus acidocaldarius*<sup>29</sup> und *Thermus thermophilus*<sup>30,31</sup> sind "Rieske"-Zentren als funktionell essentielle Untereinheiten der *bc<sub>1</sub>/b<sub>6</sub>f*-Cytochrom-Komplexe bekannt<sup>32,33</sup>. Sie besitzen ein gegenüber den Pflanzen-Typ-Ferredoxinen ( $E_0' = -400$  mV) um ca. 700 mV positiveres Redoxpotential ( $E_0' = +300$  mV). Eine dritte Gruppe von „Rieske“-Typ Proteinen wurde in bakteriellen Dioxygenasen gefunden, deren Redoxpotential liegt jedoch mit ca.  $-160$  mV zwischen dem der Pflanzen-Typ-Ferredoxine und dem der Rieske-Proteine<sup>34,35</sup>.

Die [4Fe-4S]-Zentren stellen den häufigsten Cluster-Typ in Proteinen dar und werden als "Bakterien-Ferredoxine" bezeichnet. Dieser einem verzerrten Würfel ähnelnde Cluster wird an vier Cysteinen des Proteins aufgespannt und setzt sich aus vier Atomen „nicht-Häm" Eisen und vier Atomen säurelabilen Schwefel zusammen. Wenn zwei dieser Eisen-Schwefel-Zentren innerhalb eines Proteins vorkommen, spricht man auch von sogenannten „8 Eisen-Ferredoxinen".

Es gibt auch eine Vielzahl von Eisen-Schwefel Proteinen, die [3Fe-4S]-Zentren besitzen. Je nach Protein kann es sich hierbei um eine inaktivierte Zwischenstufe, die ein Oxidationsprodukt eines [4Fe-4S]-Zentrums darstellt, oder um ein aktive prosthetische Gruppe handeln. Auch dieser Cluster-Typ ist in der Lage, Eielektronentransfer Reaktionen durchzuführen, wenngleich bei einem höheren Redoxpotential von ca.  $-100$  mV anstatt mit ca.  $-450$  mV wie im Falle von [4Fe-4S]-Zentren.

In diesem Zusammenhang ist auch die Klasse der sogenannten HIPIPs (High-Potential-Iron-Sulfur-Proteins) zu erwähnen, die in photosynthetischen Bakterien wie z.B. *Chromatium vinosum* oder *Rhodospirillum salinarum* vorkommen<sup>36</sup>. Die Besonderheit der [4Fe-4S]-Zentren in diesen kleinen Proteinen ( $\sim 6$ -10 kDa) ist ihr sehr hohes Redoxpotential mit 0 mV bis  $+500$  mV<sup>37,38</sup>. Mit diesen Proteinen werden Elektronenübertragungsprozesse in der Photosynthese<sup>39</sup> bzw. in anaeroben Stoffwechselwegen bei Bakterien<sup>40</sup> ermöglicht.

Jedoch sind Eisen-Schwefel-Zentren nicht nur an Elektronen- und Protonentransferfunktionen beteiligt, die in einem weiten Potentialbereich, je nach Cluster-Typ bzw. Protein sich unterscheiden. Vielmehr sind für diese prosthetischen Gruppen auch andere Funktionen bekannt geworden<sup>41-43</sup>.

Aufgrund ihrer besonderen Zusammensetzung sind Eisen-Schwefel-Zentren in der Lage, Elektronen innerhalb ihrer Struktur zu delokalisieren; wodurch sie Substrate polarisieren können und sich direkt an der Katalyse beteiligen. Dies wurde anhand des [4Fe-4S]-Zentrums der Aconitase und weiterer Enzyme aus der Klasse der Hydro-

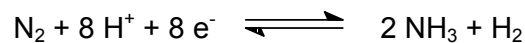
Lyasen nachgewiesen<sup>41,44</sup>. Die Aconitase katalysiert in einer Nicht-Redoxreaktion innerhalb des Citratzyklus die Isomerisierung von Citrat zu Isocitrat. Zunächst erfolgt eine Dehydratisierung zu cis-Aconitat, welches im folgenden an anderer Stelle wieder hydratisiert werden muss. Wie in Abbildung 2 gezeigt, ist ein Eisenatom des Aconitase [4Fe-4S]-Zentrums durch ein Wassermolekül und nicht durch proteingebundenes Cystein koordiniert. Dieses sogenannte „labile Eisen“ vermag die zu abstrahierende Hydroxyl-Gruppe des Isocitrat zunächst zu koordinieren, um dann als Lewis-Säure in die Katalyse einzugreifen. Ein ähnlicher Reaktionsmechanismus wurde für Fumarase a und b aus *Escherichia coli*<sup>45</sup> und auch für L-Serin-Dehydratase aus *Peptostreptococcus asaccharolyticus*<sup>46</sup> vorgeschlagen, da auch diese Enzyme ein „Aconitase-Cluster“ aufweisen und ähnliche Reaktionen katalysieren. Die Oxidation des „Aconitase-Clusters“ mit molekularem Sauerstoff führt zum Verlust des „labilen Eisen“ und zur Bildung eines [3Fe-4S]-Zentrums, einhergehend mit dem Verlust der enzymatischen Aktivität<sup>47,48</sup>. Interessanterweise kann durch Fe(II) + Sulfid das Zentrum wiederhergestellt und damit die Aktivität wiedergewonnen werden.

Die Empfindlichkeit der Eisen-Schwefel-Zentren gegenüber molekularem Sauerstoff wird auch für regulatorische Funktionen in der Zelle genutzt. Der Mechanismus zur Aktivierung bzw. Deaktivierung des Transkriptionsfaktors FNR aus *E. coli* wird über das [4Fe-4S]-Zentrum reguliert, welches bei Sauerstoff-Kontakt zu einem [2Fe-2S]-Zentrum zerfällt<sup>49,50</sup> und damit eine negative Regulation der Expression der Gene für den anaeroben Stoffwechsel in *E. coli* ermöglicht<sup>51,52</sup>. Durch den Wiederaufbau des [4Fe-4S]-Zentrums in vivo kann die Genexpression positiv reguliert werden. Ein weiteres gut untersuchtes System ist die cytoplasmatische Aconitase der Eukaryonten<sup>53,54</sup>. Dieses Protein bildet ein [4Fe-4S]-Zentrum aus, welches bei Eisenmangel in der Zelle zerfällt. In diesem Fall kann das Protein an das 5'-Ende der Ferritin m-RNA binden und damit die Translation des Ferritins negativ beeinflussen. Diese Form wird auch als „iron regulatory protein“ (IRP) bezeichnet.

Die Funktion von Eisen-Schwefel-Zentren kann auch über den Oxidationszustand geregelt werden, wie es zum Beispiel im Fall von SoxR geschieht. Der bakterielle Transkriptionsfaktor SoxR besitzt ein [2Fe-2S]-Zentrum und spielt in der oxidativen Stressantwort eine zentrale Rolle. Die Reduktion des Eisen-Schwefel-Zentrums zu [2Fe-2S]<sup>1+</sup> führt zu einer reversiblen Inaktivierung<sup>55,56</sup>. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Nitrosylierung direkt am Eisen-Schwefel-Zentrum von SoxR erfolgen kann und auch für regulatorische Zwecke genutzt wird. Dabei bildet sich ein Protein gebundenes Dinitrosyl-Eisen-Dithiol Addukt<sup>57</sup>.

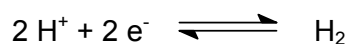
Für manche Eisen-Schwefel-Zentren werden strukturelle Funktionen angenommen; ein besonders gut untersuchtes Beispiel ist die Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase aus *Bacillus subtilis*<sup>58-60</sup>. Das [4Fe-4S]-Zentrum dieses Enzyms ist essentiell für die Ausbildung eines aktiven Enzymmoleküls, obwohl für das Zentrum keinerlei katalytische Funktion bekannt ist. Weitere Beispiele für Eisen-Schwefel-haltige Enzyme mit hypothetischer Funktion sind die DNA-Endonuklease III<sup>61-63</sup> oder die Ferredoxin:Thioredoxin-Reduktase. Für die Ferredoxin:Thioredoxin-Reduktase aus Spinat konnten allerdings Hinweise für ein Thiyl-Radikal stabilisierendes [4Fe-4S]-Zentrum erbracht werden<sup>43,64,65</sup>.

Die komplexesten Eisen-Schwefel-Zentren wurden in der Nitrogenase gefunden. Die Nitrogenase katalysiert eine außergewöhnliche Redoxreaktion, die molekularen Stickstoff zu Ammoniak reduziert:



Das P-Cluster der Nitrogenase setzt sich aus zwei [4Fe-4S]-Zentren zusammen, die miteinander über zwei Cysteine verbrückt sind und eine Disulfidbindung zwischen zwei anorganischen Sulfiden der Zentren aufbauen. Der FeMo-Kofaktor (FeMoco) aus der Nitrogenase ist eine Kombination aus einem [4Fe-3S]-Zentrum und einem [1Mo-3Fe-3S]-Zentrum, die mit drei Schwefel Liganden verbrückt sind<sup>66</sup>. Obwohl der Mechanismus der Stickstofffixierung noch nicht im Detail geklärt ist, sind Hinweise vorhanden, dass der P-Cluster für die Bereitstellung und Lagerung der 8 Elektronen, die für die Reduktion von  $\text{N}_2 + 2\text{H}^+$  gebraucht werden, benötigt wird<sup>67</sup>. Das FeMo-Zentrum stellt das aktive Zentrum dar. Untersuchungen mit Nitrogenase aus *Azotobacter vinelandii*, bei der Molybdän durch Vanadium ersetzt worden ist, haben zur Identifizierung des aktiven Zentrums beigetragen<sup>68,69</sup>.

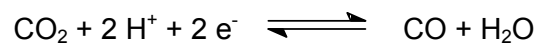
Eisen-Schwefel-Zentren kommen auch häufig in Kombination mit anderen Metallkofaktoren vor. In diesem Zusammenhang ist die Nickel-Eisen Hydrogenase zu erwähnen. Auch die Hydrogenase ist an einer außergewöhnliche Katalyse beteiligt<sup>70</sup>. Sie ist in der Lage mittels einer Redoxreaktion molekularen Wasserstoff aus Protonen und Elektronen zu bilden:



Die Aufklärung der Hydrogenase-Struktur hat gezeigt, dass die drei Eisen-Schwefel-Zentren in kurzen Abständen zueinander (<15 Å) angeordnet sind und damit für einen

intramolekularen Elektronentransport aus der Peripherie hin zum aktiven Zentrum zur Verfügung stehen. Das aktive Zentrum selbst setzt sich aus einem besonderen Ni-Fe Zentrum mit CO- und CN-Liganden zusammen<sup>71-73</sup>.

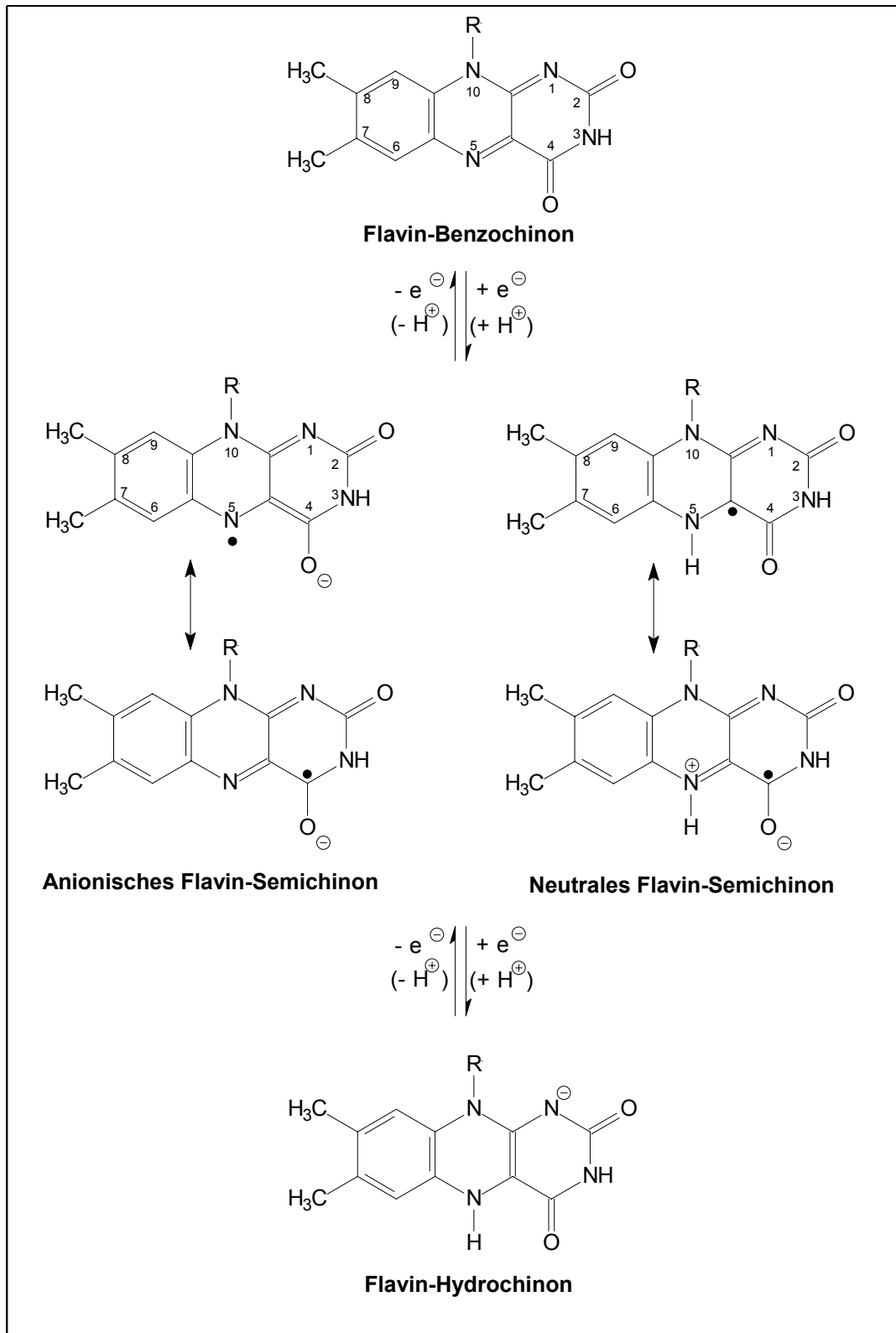
Abgesehen von weiteren interessanten Fe-S Strukturen in Proteinen ist an dieser Stelle die CO-Dehydrogenase aus dem anaeroben Bakterium *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* zu nennen<sup>74</sup>. Die CO-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von Kohlenmonoxid zu Kohlendioxid:



Die vor kurzem gelöste Struktur dieses Prototyps von Nickel enthaltenden CO-Dehydrogenasen die sowohl bei Bakterien als auch bei Archaeen vorkommen, weist fünf Metall-Zentren auf. Das aktive Zentrum besteht aus einem neuartigen, asymmetrischen [Ni-4Fe-5S]Cluster. Das Nickel-Atom ist von vier Schwefel-Liganden mit planarer Geometrie umgeben und ermöglicht die Oxidation des CO.

### 2.3 Flavine in Proteinen

Seit der Isolierung von „Old yellow enzyme“ (OYE) als erstes Flavoprotein durch Warburg und Christian im Jahre 1932 sind mittlerweile mehrere hundert Flavoproteine bekannt<sup>75-77</sup>. Neben seltenen modifizierten Flavinen kommen hauptsächlich Riboflavin, Riboflavin-5'-phosphat (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) in Proteinen vor, für die zum Teil Bindemotive aus der Primärsequenz bekannt sind<sup>78</sup>. In vielen Fällen werden Flavine fest aber nicht kovalent an das Protein gebunden. Die Dissoziationskonstanten liegen oft im nanomolaren Bereich. Bei einigen Proteinen erfolgt eine kovalente Bindung über die Methylgruppen an den C8- oder C6-Positionen des Isoalloxazin-Ringsystems<sup>75</sup>, das die reaktive Gruppe des Flavinmoleküls darstellt (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Struktur und Redoxsystem biologischer Flavine.** Es kann ein anionisches oder neutrales Semichinon gebildet werden.

Die Reaktivität eines Flavins wird hauptsächlich durch dessen Interaktion mit dem Protein bestimmt. Je nach Flavoprotein kann ein Einelektronen- oder ein

Zweielektronen-Transfer begünstigt sein. Das freie Flavin ist nicht in der Lage die Semichinon-Stufe zu stabilisieren, so dass nur ein Zweielektronen-Transfer mit einem Redoxpotential von  $E_0' = -220$  mV möglich ist. Die Aufnahme von nur einem Elektron und die thermodynamische Stabilisierung dieses intermediären organischen Radikals (Semichinon) ist nur bei bestimmten Flavoproteinen möglich<sup>79</sup>. Der Einfluss des Proteins auf die Reaktivität des Flavins ist besonders anschaulich in den weit auseinander liegenden Potentialen für die beiden möglichen Redox-Übergänge zu sehen. Flavodoxine sind wie die Ferredoxine kleine Proteine (ca. 15 kDa), die in der Zelle Einelektron-Transport Funktionen erfüllen<sup>82</sup>.

Bei einer Flavin-katalysierten Reaktion können je nach Enzym bestimmte Bereiche des Isoalloxazin-Ringssystems dem Substrat zugänglich und dadurch die Katalyse reguliert werden<sup>76</sup>. Dies ist zum Beispiel bei der Aktivierung von molekularem Sauerstoff zum Hydroperoxid über die Zwischenstufe eines kovalenten Addukts an der C4 $\alpha$ -Position des Flavins von Bedeutung. Aufgrund dieser Variationsmöglichkeiten durch das Protein ist es nicht verwunderlich, dass Flavoproteine neben typischen Redoxreaktionen wie Dehydrogenierungen oder die Aktivierung von Sauerstoff (Oxidasen, Hydroxylasen) bis hin zu lichtabhängigen Reaktionen wie DNA Reparatur (DNA-Photolyase<sup>83,84</sup>) oder zur Lichtentstehung in der Luciferase aus *Vibrio harveyi* beteiligt sind<sup>77,85</sup>. Seit kurzem wurde die Beteiligung von Flavoproteinen an Blaulicht-Effekten bei Pflanzen als auch im circadianen Rhythmus von Säugern gezeigt<sup>86,87</sup>. Wie bei der DNA-Photolyase fungiert hier die Flavingruppe als Lichtfänger und leitet die Energie zum Reaktionszentrum weiter.

Abgesehen von sogenannten einfachen Flavoproteinen gibt es die komplexen Metalloflavoproteine. Die meisten von ihnen besitzen Eisen-Schwefel-Zentren und Flavin Kofaktoren. Ein sehr gut untersuchtes Enzym ist die Trimethylamin-Dehydrogenase aus methylotrophen Bakterien, die die oxidative Demethylierung von Trimethylamin zu Formaldehyd und Dimethylamin katalysiert<sup>88,89</sup>. In diesem Enzym sind ein [4Fe-4S]-Zentrum und ein kovalent gebundenes FMN in einem Abstand von 4,6 Angström zueinander lokalisiert. Durch diese Nähe ist eine magnetische Kopplung beider prosthetischen Gruppen möglich<sup>90</sup>. Der Elektronentransfer zwischen beiden prosthetischen Gruppen konnte nachgewiesen werden und ist elementar für die Katalyse.

## 2.4 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium aminobutyricum*

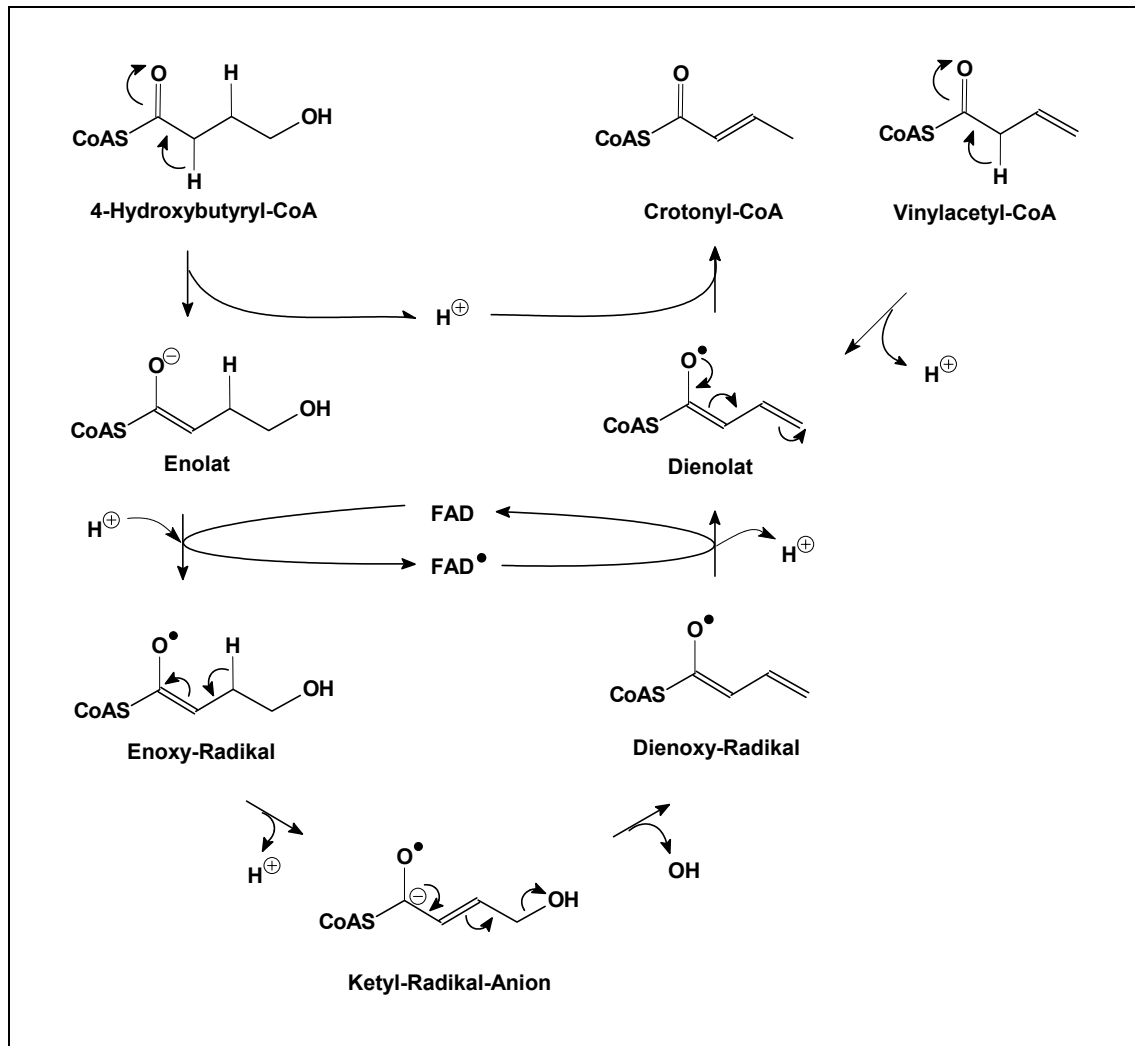
Die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase konnte von Willadsen & Buckel durch den Einsatz von 4-Hydroxy[3-<sup>3</sup>H]butyrat in Rohextrakten von *C. aminobutyricum* nachgewiesen werden<sup>10</sup>. Das Enzym wurde anschließend aus *C. aminobutyricum* und *Clostridium kluyveri* bis zur Homogenität gereinigt<sup>11,91</sup>. Neuere Untersuchungen von Astrid Gerhardt haben gezeigt, dass die von dem Gen der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase abgeleitete Aminosäuresequenz signifikante Identitäten zu hypothetischen Proteinen von *Clostridium difficile*, *Porphyromonas gingivalis* und *Archaeoglobus fulgidus* aufweist<sup>92</sup>. Daher ist anzunehmen, dass wahrscheinlich in diesen Organismen auch eine 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase existiert; der biochemische Nachweis steht aber noch aus. In diesem Zusammenhang sind die Aminosäuresequenz-Identitäten zu den drei Proteinen aus *Archaeoglobus fulgidus*, die von *hpaA-1*, *hpaA-2* und *hpaA-3* kodiert werden sehr interessant. Diese Proteine, denen eine Hydratase Funktion<sup>93</sup> zugeordnet worden ist, zeigen Identitäten zu 54% zur 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus *C. aminobutyricum*, obwohl sie phylogenetisch zu den Archaea zugeordnet werden. Da keine Ähnlichkeiten zu Proteinen aus den Genomsequenzen anderer Archeen existieren, stellt sich die Frage ob *Archaeoglobus fulgidus* wirklich ein Beispiel für die Existenz der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in einem anderen Reich als das der Bacteria darstellt<sup>94</sup>, oder ob hier ein weiteres Beispiel für die Sonderstellung von *Archaeoglobus* innerhalb der Archaea gegeben ist<sup>95</sup>.

Die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus *C. aminobutyricum* ist ein Eisen-Schwefel-Flavoenzym mit einer molekularen Masse von 54 kDa pro Untereinheit. Für dieses homotetramere Enzym wurden 2 FAD, maximal 16 Nicht-Häm Eisen und 16 säurelabile Schwefel bestimmt<sup>11</sup>. Mit UV-Vis, EPR- und Mössbauer-spektroskopischen Untersuchungen wurden Hinweise für die Existenz eines diamagnetischen [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum und die Bildung eines stabilisierten FAD-Semichinon erbracht. Die Redoxpotentiale des FAD wurden mit  $FAD_{ox/sq} = -140 \text{ mV}$  bzw.  $FAD_{sq/hq} = -240 \text{ mV}$  bestimmt. Die Reduktion der [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentren zu [4Fe-4S]<sup>1+</sup>-Zentren konnte nur durch intensive Photoreduktion in der Gegenwart von 5-Deazaflavin für einen geringen Prozentsatz der gesamten Eisen-Schwefel-Zentren erreicht werden<sup>97,98</sup>. Dieser Befund deutete auf die Existenz von Eisen-Schwefel-Zentren mit ungewöhnlich niedrigen Redoxpotentialen hin. Sauerstoff Exposition führt zu einem irreversiblen Verlust der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase-Aktivität, während bis zu 40% der Vinylacetyl-CoA Isomerase-Aktivität unter diesen Bedingungen erhalten bleibt<sup>97</sup>. Es ist anzunehmen, dass die Sauerstoff-Inaktivierung durch die Zerstörung der Eisen-Schwefel-Zentren erfolgt; jedoch konnte bisher die Bildung eines [3Fe-4S]<sup>1+/0</sup>-Zentrums oder [2Fe-

$2S]^{2+/1+}$ -Zentrums als intermediäres Zerstörungsprodukt, wie es in vielen anderen Eisen-Schwefel Proteinen bekannt ist, nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise führt eine Sauerstoff-Inaktivierung zu einer vollständigen Zerstörung des Zentrums.

Für die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurde ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, der die mechanistisch noch nicht verstandene Abstrahierung eines nicht-aktivierten Protons ermöglichen könnte. Der postulierte "Ketyl-Mechanismus" stellt ein Redoxmechanismus für eine Nicht-Redox Reaktion wie die Dehydratisierung dar, in dem Eielektronen-Transferschritte die Aktivierung des  $\beta$ -ständigen Wasserstoff ermöglichen. Die Dehydratisierung erfolgt nur dann, wenn das FAD oxidiert vorliegt<sup>11</sup>. Demnach könnte das FAD der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase, welches in der Lage ist ein Semichinon zu stabilisieren, die Funktion einer Substratradikal generierenden prosthetischen Gruppe darstellen. Es stellt sich die Frage, ob das FAD in der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase diese Chemie ermöglichen kann, da bislang noch bei keinem Enzym eine vergleichbare Reaktion nachgewiesen werden konnte. In dem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus wird zunächst das  $\alpha$ -ständige Proton ( $pK_S$ -Wert  $< 20$ ) des 4-Hydroxybutyryl-CoA abstrahiert (Abbildung 4). Diese Reaktion kann durch eine basische Aminosäure des Enzyms erfolgen. Der  $pK_S$ -Wert der Abgangsgruppe wird durch die elektronenziehende Thioesterbindung herabgesetzt und damit die Reaktion erleichtert. Diese Teilreaktion der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wird auch für den Mechanismus der Enoyl-CoA-Hydratase (Crotonase) diskutiert. Die Strukturaufklärung der Crotonase hat die Existenz von zwei Glutamatresten im aktiven Zentrum gezeigt, welche für die Abstrahierung des aktivierten Protons in Frage kommen<sup>99</sup>.





**Abbildung 4: Hypothetischer Reaktionsmechanismus der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (modifiziert nach<sup>18,97</sup>).** Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA und Einschleuung von Vinylacetyl-CoA.

Die Bestimmung von kinetischen Isotopeneffekten mit regiospezifisch deuterierten Substraten hat gezeigt, dass dieser erste Schritt im postulierten Mechanismus geschwindigkeitsbestimmend ist und einen kinetischen Isotopeneffekt  $^D(k_{\text{cat}}/K_m)$  von  $2,0 \pm 0,1$  aufweist, während die Spaltung der C-H-Bindung am C3 nur einen Isotopeneffekt von  $1,3 \pm 0,2$  zeigt<sup>100</sup>. Im Weiteren wird das entstandene Enolat in einer Einelektronen Stufe zu einem Enoxy-Radikal oxidiert, einhergehend mit der Reduktion des FAD-Benzochinons zum Semichinon. Die Deprotonierung am C-Atom ist durch die Bildung des Ketyl-Radikalanions erleichtert. Im folgenden wird die Hydroxylgruppe an C-4 abstrahiert. Diese Reaktion könnte durch eine Polarisierung der Hydroxygruppe an das Eisen-Schwefel-Zentrum begünstigt sein. Dadurch kann das Dienoxy-Radikal entstehen, welches von dem FAD-Semichinon zum Dienolat reduziert wird. Dabei wird

das FAD in den ursprünglichen aktiven Zustand zurückversetzt. Abschließend wird das Dienolat zum Produkt Crotonyl-CoA protoniert. Dieses Dienolat kann auch bei der Abstrahierung des  $\alpha$ -ständigen Protons von Vinylacetyl-CoA entstehen, wodurch die ebenfalls beobachtete Isomerase Aktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase erklärt werden kann.

Die Funktion des FAD als auch der Eisen-Schwefel-Zentren in der Katalyse konnte noch nicht geklärt werden. Hinweise zu einer Substrat-induzierten Bildung eines FAD-Semichinons oder eines Substratradikals wurden bisher nicht gefunden. Zudem ist die Beteiligung der Eisen-Schwefel-Zentren an der Katalyse nicht geklärt.

## 2.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der prosthetischen Gruppen der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus *C. aminobutyricum* im Hinblick auf deren Funktion im Reaktionsmechanismus.

Mittels spektroskopischer Techniken wie UV-Vis-, EPR-, ENDOR- und Mössbauer-Spektroskopie sollen Hinweise für die Zusammensetzung, den Aufbau und die Rolle von FAD und Eisen-Schwefel-Zentren in der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase gefunden werden.

Im weiteren sollen durch die Anwendung von statischen und dynamischen elektrochemischen Methoden die Redox Eigenschaften der Kofaktoren bestimmt und deren Rolle in der Katalyse verstanden werden.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Verwendetes Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), oder Aldrich (Steinheim) bezogen. Für die Proteinbestimmung nach Pierce wurde das BCA-Kit von Pierce (Rockford, USA) verwendet. Für die Protein Kristallisation wurde das Set Crystal screen I und II der Firma Hampton Research (USA) benutzt.

##### 3.1.2 Biochemikalien und Enzyme

Die verwendeten Enzyme oder Coenzyme wurden von Boehringer Mannheim (Mannheim), BioMol (Hamburg) geliefert. Der Molekularmassenstandard für SDS-PAGE stammte von Amersham-Pharmacia (Freiburg). 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase wurde nach dem Verfahren von Scherf & Buckel (1991) gereinigt. Die für den 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase-Test benötigten Hilfsenzyme mit den Enzymen Crotonase, 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase, Acetyl-CoA-Acetyltransferase und Phosphotransacetylase wurde von Frau Iris Schall aus *Acidaminococcus fermentans* als „Enzym-Pool“ gereinigt und zur Verfügung gestellt<sup>101</sup>. Die CoA-Ester Acetyl-CoA, Propionyl-CoA, Butyryl-CoA und 4-Hydroxybutyryl-CoA wurden nach der Methode von Simon & Shemin synthetisiert. Vinylacetyl-CoA und 4-Hydroxybutyryl-CoA wurden aus Acetyl-CoA und Vinylacetat bzw. 4-Hydroxybutyrat enzymatisch mit der 4-Hydroxybutyrat-CoA Transferase hergestellt<sup>102</sup>. 5-Deaza-10-methyl-3-sulfopropyl-isoalloxazin ("5-Deazaflavin")<sup>103</sup> wurde freundlicherweise von Frau Dr. M. Medina, Universität Saragossa zur Verfügung gestellt.

##### 3.1.3 Gase

N<sub>2</sub> (99,996%), N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (95:5 v/v), flüssiger Stickstoff und flüssiges Helium wurden von Messer Griesheim (Düsseldorf) bezogen.

##### 3.1.4 Säulenmaterialien und Fertigsäulen

Die FPLC-Fertigsäulen HiLoad 26/10, Phenyl-Sepharose HR und DEAE-Sepharose Fast Flow-Material und Sephadex G25 NAP-Säulen wurden von der Firma

Amersham-Pharmacia (Freiburg) erhalten. HPLC-Säulen wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.

Dowex 1-X8, 100 - 200 mesh pract. und Dowex 50-X8, 100 - 200 mesh pract., Chlorid-Form wurde von Serva (Heidelberg) bezogen.

### 3.1.5 Geräte

Die Anaerobenzelle stammten von Coy Laboratories (Ann Arbor MI, USA), die mit einem Stickstoff/Wasserstoff Gemisch (95:5 v/v) befüllt waren. Die Enzympräparationen wurden an einer FPLC-Anlage der Firma Pharmacia (Freiburg) durchgeführt. Die Aufreinigung von CoA-Estern und Flavinderivaten erfolgte an einer HPLC-Anlage der Firma Sykam (Gilching bei München). Die photometrischen Enzymtests wurden mit einem Kontron Uvikon 900 Zweistrahlphotometer (Eiching bei München) als auch Pharmacia Ultrospec 4000 Einstrahlphotometer durchgeführt (Freiburg). Kinetiken im Millisekunden-Bereich wurden mit einer SF-61MX Stopped-Flow Apparatur von Hi-Tech Scientific (Salisbury, U.K.) aufgenommen. Die Daten wurden mit einer Quecksilber Bogenlampe bei definierten Wellenlängen als Absorption ermittelt und mit der Hi-Tech Scientific Software bearbeitet. Die Aufnahme von CD-Spektren erfolgte an einem Jasco J-720 Spektropolarimeter im Wellenlängenbereich von 200 bis 800nm, mit einer spektralen Bandbreite von 2 nm und einer Scangeschwindigkeit von 200 nm/sec. Die Messungen erfolgten in einer speziell konstruierten OTTLE-Zelle unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre<sup>35</sup>. Cyclische Voltammogramme wurden in einer CV-Apparatur nach Hagen<sup>104</sup> unter Argon-Atmosphäre aufgenommen. Das Potential wurde mit einem Autolab PGSTAT-10 Potentiostaten (Deutsche Metrohm, Filderstadt) kontrolliert. Die EPR-Spektren wurden mit einem Bruker ESP300 EPR Spektrometer bzw. einem Bruker EMX-6/1 EPR Spektrometer, jeweils bestückt mit einem Standard TE102 Resonanzkörper für X-Band (~9 GHz) Messungen aufgenommen. Die Temperatur im Bereich von 4,2 bis 300 K wurde mit einem Oxford Instruments ESR900 bzw. ER-4112HV Helium-Fluss Kryostaten, reguliert durch eine ITC4 Temperatur-Einheit erhalten. Aufgrund von Temperatur-Gradienten ist die absolute Temperatur unter 10K nicht genau bestimmbar und daher nur indikativ verwendbar. Aufnahmen in flüssigem Stickstoff (77K) wurden mit einem Fingerdewar aus hochreinem Quarz durchgeführt. Die Aufnahme der ENDOR Spektren erfolgte an einem Standard Bruker ESP300 EPR Spektrometer, ausgerüstet mit einem TM110 Resonanzkörper und einem ENI 200 W Radiofrequenz Verstärker. Die Radiofrequenz modulierten Spektren werden als erste Ableitung aufgenommen. Die erhaltenen

Spektren sind zumeist Akkumulationen mehrerer Spektren, auf deren Anzahl im Text verwiesen wird. Die Temperatur wurde mit einem Oxford Instruments ESR900 Helium Kryostaten reguliert. Q-Band (~35 GHz) EPR-Spektren wurden am MPI für Strahlenchemie in Mülheim/Ruhr mit einem Bruker ESP300E EPR Spektrometer, ausgestattet mit einem Helium Fluß Kryostaten ESR910 von Oxford Instruments, aufgenommen. Die Auswertung der erhaltenen Spektren wurde mit dem Bruker WINEPR Programm (Version 2.11) durchgeführt. 140 GHz EPR-Spektren wurden in einem hochempfindlichen gepulsten Spektrometer im Labor von R.G. Griffin, Francis Bitter Magnetory Lab (MIT, Boston) aufgenommen<sup>105</sup>. Mössbauer Spektren wurden mit einem alternierend konstant beschleunigenden Spektrometer am Max-Planck-Institut für Strahlenchemie in Mülheim/Ruhr aufgenommen. Die Temperatur wurde mit einem Oxford Variox oder einem Oxford Mössbauer-Spektromag Kryostaten eingestellt. Mit letztgenanntem kann ein externes Magnetfeld von bis zu 8 T im Temperaturbereich von 1,5-250 K angelegt werden. Das angelegte Magnetfeld zur Probe steht in einem Winkel von 90 °C zur  $\gamma$ -Strahlung. Die  $^{57}\text{Co/Rh}$ -Quelle für die Emission der  $\gamma$ -Strahlung befindet sich in einem Abstand von ca. 85 mm zur Probe. Alle angegebenen Isomerieverschiebungen beziehen sich relativ zu metallischem Eisen bei 300K.

## 3.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1 Verwendete Bakterien

*Clostridium aminobutyricum* (DSM 2634; *Clostridium sp.*) wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) bezogen.

### 3.2.2 Kulturmedium und Fermentation im 100 l Fermenter

Die Züchtung von *C. aminobutyricum* erfolgte bei 37 °C in einem komplexen anaeroben Medium (Tabelle 1).

**Tabelle 1:  $\gamma$ -Aminobutyrat/ Hefeextrakt-Kulturmedium für *C. aminobutyricum* nach Hardman<sup>106</sup>, modifiziert nach Willadsen und Buckel<sup>10</sup>.**

Komponenten	Menge pro l H <sub>2</sub> O dest.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,1 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,0 g
Hefe-Extrakt	3,0 g
$\gamma$ -Aminobuttersäure	10,0 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,2 g
FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,01 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	1,0 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,0 mg
Cystein-Chlorid x H <sub>2</sub> O	0,5 g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0,35 g

Für die Stammhaltung wurden 120 ml-Serumflaschen mit 50 ml Medium verwendet. Das Medium wurde durch 10 minütiges Evakuieren bei 4 kPa in der Schleuse des Anaerobenzeltes (Coy, Ann Arbor, MI; USA) weitgehend entgast und anschließend im Anaerobenzelt mit dem Reduktionsmittel Natriumdithionit versetzt. Die Serumflaschen wurden mit Medium gefüllt und mit Butylgummistopfen sowie Aluminium-Bördelkappen verschlossen. Vor dem Autoklavieren wurden die Gasphasen der gefüllten Flaschen mit N<sub>2</sub> mit einem Überdruck von 30 kPa abgefüllt. Die Sterilisation erfolgte in einem Autoklaven (Aesculap, Tuttlingen) über 20 Minuten bei 120 °C und bei einem Überdruck von 100 kPa. Die Stammkulturen wurden jeweils 10 %ig angeimpft und für 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die angewachsenen Kulturen konnten bei 4 °C für über 4 Wochen gelagert werden. Für die Enzympräparationen wurden Zellen benutzt, die im 100 l-Fermenter (Biostat 100 D, Braun-Melsungen AG) gezogen wurden. Die Medien wurden im Fermenter autoklaviert, während des Abkühlens durch Begasen mit Stickstoff-Kohlendioxid-Gas (80%/20%) anaerobisiert und anschließend mit 30 kPa Überdruck versehen. Als Inokulum dienten 10 l einer stationären Kultur, die einen Tag vorher frisch angeimpft wurde. Die Inkubation erfolgte unter stetigem Rühren bei 37 °C.

Die Zellernte wurde unter partiell anaeroben Bedingungen mit einer Durchflusszentrifuge (Contifuge 17 RS, Rotor 8575, Heraerus Sepatech) bei 4 °C,

20.000 x g und einer Durchflussrate von 0,5 l/min durchgeführt. Die ankonzentrierte Zellmasse wurde unter semi-anaeroben Bedingungen schnell bei -80 °C eingefroren und gelagert.

### 3.3 Biochemische Methoden

#### 3.3.1 Präparation der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus *C. aminobutyricum*

Die gesamte Reinigungsprozedur mit Ausnahme der Zentrifugation wurde bei 17 °C in einem Anaerobenzelt (Coy, Ann Arbor) durchgeführt, dessen Atmosphäre sich aus Formiergas mit 95% N<sub>2</sub> und 5% H<sub>2</sub> zusammensetzte. Die maximale Dauer einer Enzympräparation betrug ca. 12 Stunden. Ein Palladium-Katalysator (BASF, Mannheim) sorgte für die Beseitigung von geringen Sauerstoffmengen. Die verwendeten Puffer wurden zunächst mit einem 0,2 µm-Filter filtriert, im Autoklaven erhitzt und bis zum Erkalten mit einer Vakuum-Membranpumpe (MZ 2C, Vaccubrand, Wertheim) entgast. Die Zugabe der Reduktionsmittel Na-Natriumdithionit und DTT zu den Puffern erfolgte im Anaerobenzelt. Alle Materialien aus Kunststoff wurden vor ihrer Benutzung mindestens 24 Stunden im Anaerobenzelt gelagert. Die Reinigung erfolgte mittels einer FPLC-Anlage (Amersham-Pharmacia, Freiburg). Proteine wurden mit einem Durchflussphotometer bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert.

##### 3.3.1.1 Herstellung von Zellextrakten

Feuchtzellen von *C. aminobutyricum* (20g) wurden in 80 ml Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4, der 3,5 mM Na-Natriumdithionit und 1 mg Desoxyribonuclease I enthielt, suspendiert. Die Zellsuspension wurde in einem Rosettengefäß in einem Eisbad viermal 6 min unter einer kontinuierlichen Beschallung von 70 W mit einem Ultraschallgerät (Branson Sonifer, Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA) aufgeschlossen. Zwischen dem Aufschlussvorgang wurden jeweils 10 minütige Pausen zur Abkühlung der Zellsuspension eingelegt. Der Zellaufschluss wurde in Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen überführt, luftdicht verschlossen und 70 min bei 100.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder ins Anaerobenzelt überführt, durch Filtration (0,45 µm-Filter) von Partikeln befreit und für die weitere Präparation verwendet.

### 3.3.1.2 Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sepharose FF

Der Überstand wurde mit einer Flussrate von 4 ml/min auf eine DEAE-Sepharose Fast-Flow-Säule (2,6 x 14 cm) aufgetragen, die zuvor mit 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4, 2 mM DTT equilibriert worden war. Die Säule wurde mit 80 ml des gleichen Puffers gewaschen und die Proteine mit einem linearen Ammoniumsulfat-Gradienten von 0 bis 0,4 M (500ml) bei einer Flussrate von 4 ml/min eluiert. 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase eluierte mit 0,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in einem Volumen von 70 ml.

### 3.3.1.3 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl-Sepharose

Die aktiven Fraktionen des DEAE-Sepharose-Laufs wurden vereinigt und ihre  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration auf 1 M mit 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung eingestellt. Die Phenyl-Sepharose HiLoad Säule (2,6 x 20 cm) wurde mit 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in 50 mM Kaliumphosphat pH 7,4 und 2 mM DTT equilibriert, bevor das Protein aufgetragen wurde. Die Säule wurde mit einer Flussrate von 4 ml/min mit 80 ml der gleichen Salzlösung gespült. Nach einem Stufengradienten auf 0,55 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  wurde die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit einem linearen Gradienten von 0,55 M – 0,40 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (200ml) von der Säule eluiert. Aktive Enzymfraktionen eluierten bei einer  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration von 0,5 M in einem Gesamtvolumen von 50 ml. Das Eluat wurde durch Ultrafiltration (YM 30-Membran, Amicon-Millipore, Witten) ankonzentriert und durch wiederholtes verdünnen und konzentrieren in 50 mM Hepes Puffer pH 7,5 umgepuffert. Aufgrund der Reduktionsmittel Natriumdithionit und DTT in den Chromatographie-Puffern wurde die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase während der Reinigung teilweise reduziert. Da die oxidierte Dehydratase (FAD-Benzochinin) das aktive Enzym darstellt, mussten die Präparationen vor dem Gebrauch oxidiert werden. In der Regel wurde mit einem Überschuss an DCPIP die Dehydratase schonend oxidiert und anschließend das DCPIP und die Reduktionsmittel mittels einer Sephadex-G25 Gelfiltrationssäule von dem Protein getrennt.



### 3.3.2 Enzymtests

#### 3.3.2.1 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase-Test

Die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase-Aktivität wurde mit Hilfsenzymen (Crotonase, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase, Thiolase, Phosphotransacetylase) aus einer partiell angereinigten Proteinfraction („Enzym-Pool“) aus *Acidaminococcus fermentans* und der Zugabe von 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase aus *C. aminobutyricum* bestimmt. Es wird die Absorptionszunahme von NADH bei 340 nm bestimmt.

**Tabelle 2: Testansatz zur Bestimmung der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase-Aktivität**

Komponenten	Volumina [μl]	Konz. im Test (mM)
1,0 M Kaliumphosphat pH 7,0	100	100
0,1 M EDTA	20	2
0,1 M DTE	20	2
0,1 M NAD <sup>+</sup>	10	1
0,1 M 4-Hydroxybutyrat	10	1
0,01 M CoASH	10	0,1
0,01 M Acetyl-Phosphat	10	0,1
0,05 M Acetyl-CoA	10	0,5
4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase (140 U/ml)	10	1,4 U/ml
<i>A. fermentans</i> Proteinfraction (13 mg/ml)	20	0,26 mg/ml
+ 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase		
ad 1,0 ml H <sub>2</sub> O dest.		

#### 3.3.2.2 Vinylacetyl-CoA-Isomerase-Test

Vinylacetyl-CoA-Isomerase-Aktivität wurde mit dem zuvor beschriebenen Test ermittelt, wobei Na-4-Hydroxybutyrat durch Vinylacetat bzw. 4-Hydroxybutyryl-CoA durch Vinylacetyl-CoA ersetzt wurde.

#### 3.3.2.3 Enzymtest zur Konzentrationsbestimmung von CoA-Derivaten

Die Konzentrationen der synthetisierten CoA-Derivate wurde in einem Testansatz mit Citrat-Synthase als Hilfsenzym und DTNB [5,5'-Dithiobis 2-Nitrobenzoat] als Farbreagenz durchgeführt. Zur Bestimmung von Vinylacetyl-CoA

wurde zusätzlich die 4-Hydroxybutyrat-CoA Transferase eingesetzt. Die Reaktion von DTNB mit freien SH-Gruppen wurde durch die Absorptionszunahme bei 412 nm verfolgt ( $\epsilon_{412} = 13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

**Tabelle 3: Testansatz zur Konzentrationsbestimmung von CoA-Derivaten**

Test-Komponenten	Volumina ( $\mu\text{l}$ )	Konz. im Test (mM)	
H <sub>2</sub> O dest.	ad 1000		
1,0 M Kaliumphosphat pH 7,0	100	100	
0,1 M Oxalessigsäure	10	1	
0,05 M DTNB	20	1	= E1
Probe			= E2
Citrat-Synthase (55 U/ml)	10	0,55 U/ml	= E3
4-Hydroxybutyrat-CoA- Transferase (140 U/ml)	10	1,40 U/ml	
1 M Na-Acetat	100	100	= E4

Die Absorption wurde vor Zugabe der Probe (*E1*), danach (*E2*) und nach Zugabe von Citrat-Synthase (*E3*) sowie nach Zugabe der 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase bestimmt. Die Differenz aus *E2* – *E1* ergibt die Konzentration an freiem CoASH welches z.T. aus der Synthese stammt. Aus der Differenz von *E3* - *E2* kann die Konzentration von Acetyl-CoA ermittelt werden. Die Differenz aus *E4* - *E3* entspricht der Konzentration des CoA Derivats, welches mit der Transferase zu Acetyl-CoA umgesetzt werden kann (4-Hydroxybutyryl-CoA, Vinylacetyl-CoA, u.a.).

### 3.3.3 UV-Vis Stopped-flow Analysen

Kinetiken im Millisekunden Bereich wurden mit einer SF-61MX Stopped Flow Apparatur der Firma Hi-Tech Scientific, Salisbury U.K. ermittelt. Als Lichtquelle diente eine Quecksilber-Bogenlampe. Absorptionsänderungen über definierte Wellenlängen wurden mit einem Photomultiplier erfasst und gegen die Zeit aufgetragen. Die erhaltenen Daten wurden mit der Hi-Tech Software ausgewertet. Zur Bestimmung der Wechselrate einer Reaktion wurden jeweils 6 Einzelmessungen gemacht, mit einer exponentiellen Funktion gefittet und daraus der Mittelwert errechnet. Zur Überprüfung von Messartefakten wurde jeweils vor und nach einer Messserie die Substanz mit anaerobem Puffer gemischt und analysiert. Das Injektionsvolumen betrug immer 100  $\mu\text{l}$ . Die Totzeit der Apparatur wurde über die Reduktion von DCPIP mittels Ascorbinsäure auf 2,3 ms bestimmt<sup>107,108</sup>.

Zur anaeroben Probenbeladung der Stopped flow Apparatur wurden gasdichte Glasspritzen verwendet. Diese wurden im Anaerobenzelt befüllt, über eine Kanüle mit Gummistopfen verschlossen und erst nach dem Aufsetzen auf die Mischvorrichtung geöffnet. Die Mischvorrichtung wurde zuvor mit anaerobem Puffer gewaschen und beladen. Die ersten 300µl der anaeroben Lösungen wurden über den Abführkanal verworfen.

#### 3.3.4 Protein Kristallisation

Kristalle der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurden im Anaerobenzelt bei 18 °C mit der "hanging-drop vapor diffusion" Methode gezogen. Die Komponenten des Hampton Research Crystal Screen Kit I und II wurden zunächst anaerobisiert. Jeder Tropfen setzt sich aus 5 µl der Proteinlösung (10-15 mg/ml) und derselben Menge Kristallisierungslösung zusammen. Die Kristallisationsansätze wurden mit und ohne Crotonyl-CoA durchgeführt. Der Tropfen wurde auf einem silanisierten Glasplättchen aufgebracht, welches kopfüber auf einer mit derselben Kristallisierungslösung (1 ml) vorgelegte Mikrotiter-Platte (Nunc) aufgelegt wurde. Die Glasplättchen wurden mit Silikon versiegelt und im Anaerobenzelt bei 18 °C gelagert.

### 3.4 Analytische Methoden

#### 3.4.1 Proteinbestimmung

#### 3.4.2 Mikro-Biuret Methode mit TCA-DOC Fällung

Das Testprinzip dieser Proteinbestimmung basiert auf der Biuret-Reaktion, jedoch wird hierbei das Protein zuvor mittels TCA-Fällung von Störfaktoren getrennt.

##### *Test Komponenten:*

Natrium Deoxycholat (DOC) 0,15%, m/v

Trichloressigsäure (TCA) 70% m/v

NaOH (0,75M)

Mikrobiuret-Lösung 173 g Trinatrium Citrat Dihydrat und 100g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in Seradest lösen und auf 600ml auffüllen (*Lösung 1*).

17,3 g CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O in 300ml warmem Seradest lösen. Diese Lösung langsam zur *Lösung 1* unter Rühren hinzugeben. Das Volumen auf 1 l auffüllen. Die blaue Lösung ist über mehrere Monate hinweg im Dunkeln stabil.

### Rinderserumalbumin-Standard (BSA)

Aufgrund der stark hygroskopischen Eigenschaften des Rinderserumalbumins ist die gravimetrische Erstellung eines Standards mit Fehlern behaftet. Die Konzentration kann gewöhnlich spektrophotometrisch erfolgen. Eine 1mg/ml BSA-Lösung besitzt eine Absorption von 0,667 bei einer Wellenlänge von 279 nm.

#### *Prozedur:*

##### a) Protein-Präzipitation

Je 0,1 ml Probe oder Standard (100-600 µg Protein) wurden auf 1ml im Eppendorf-Cup mit Seradest aufgefüllt. Es wurde jeweils 0,1 ml 0,15%ige DOC zugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde durch die Zugabe von 0,1ml 70%iger TCA-Lösung das Protein gefällt, und 5 Minuten bei 9000 x g in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe abgenommen.

##### b) Lösen des Protein-Präzipitats

Durch die Zugabe von je 1 ml 3%iger NaOH Lösung wurde das Präzipitat in Lösung gebracht.

##### c) Biuret Reaktion

Es wurde jeweils 50µl der Biuret Reagenz zugegeben, geschüttelt und bei Raumtemperatur mindestens 10 Minuten im Dunkeln inkubiert.

##### d) Photometrische Messung

Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 545 nm mit Wasser als Blindwert ermittelt.

#### 3.4.2.1 Pierce-BCA-Macro-Assay

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Pierce-BCA-Macro-Assay<sup>109</sup> bestimmt. Das Testprinzip erweitert die Biuret-Reaktion (Protein komplexiert und reduziert  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen unter alkalischen Bedingungen), indem Bicinchoninsäure (2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure-Dinatriumsalz) mit  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen einen farbigen Komplex bildet, welcher ein Absorptionsmaximum bei 562 nm besitzt.

Je 0,1 ml Probe oder Standard (20-2000 µg Protein) wurden mit 2 ml Reagentienmix gemischt, für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 562 nm

bestimmt. Als Blindwert wurde 0,1 ml H<sub>2</sub>O dest. und als Standard Rinderserumalbumin verwendet.

### 3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Homogenität von Proteinpräparationen wurde mit der Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode von Laemmli<sup>110</sup> bestimmt. Die SDS-PAGE wurde in einer Mini Protean II-Elektrophorese-Apparatur (BIO-RAD, München) durchgeführt.

**Tabelle 4: Zusammensetzung der 13,5 %igen Polyacrylamid-Gele**

Komponenten	Trenngel (13,5 %)	Sammelgel (5%)
1 M Tris/HCl	4,20 ml (pH 8,8)	0,40 ml (pH 6,8)
H <sub>2</sub> O dest.	2,30 ml	2,65 ml
40% Acrylamid/ 1,6% Bisacrylamid	3,25 ml	0,45 ml
5% TEMED	0,10 ml	0,04 ml
10% SDS	0,10 ml	0,04 ml
10% Ammoniumperoxodisulfat	0,12 ml	0,08 ml

Vor der Elektrophorese wurden die Proben mit dem halben Volumen Probenpuffer (125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 10 % Glycerin, 10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol, 4 % SDS und 0,02 % Bromphenolblau) versetzt und für 10 min bei 100 °C denaturiert. Von diesen Proben wurden jeweils 5-20  $\mu$ l pro Spur auf das Gel aufgetragen. Als Molekularmassenstandard wurde eine Mischung aus Phosphorylase b (94 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa) und  $\alpha$ -Lactalbumin (14,4 kDa) verwendet. Als Elektrodenpuffer wurde Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,8) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V (Mini Power Pack P 20, Biometra, Göttingen) so lange, bis der Bromphenolblau-Marker soeben aus dem Gel herausgewandert war. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliantblau R-250 gefärbt. Dazu wurde das Gel in einer 0,1 % (m/v) Lösung des Farbstoffes in Methanol/Wasser/Eisessig (5:4:1, v/v/v) bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde nicht gebundener Farbstoff mit einem Wasser/Methanol/Eisessig (5:4:1)-Gemisch über Nacht auf dem Schüttler entfernt.

#### 3.4.4 UV-Vis spektroskopische Konzentrationsbestimmung von FAD

Zur Bestimmung des Flavingehalts wurden alle 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase-Proben mit 3%iger TCA-Lösung oder einer 10 minütigen Hitzebehandlung bei 80°C denaturiert. Der Niederschlag wurde bei 9000 x g abzentrifugiert; der Überstand wurde für die spektroskopische Ermittlung der Flavinkonzentration herangezogen. Die Berechnung erfolgte auf der Basis des in der Literatur angegebenen Extinktionskoeffizienten von 11,3 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> für freies FAD bei 445 nm<sup>111</sup>.

#### 3.4.5 HPLC-Analyse von Flavinderivaten

Nach einem Denaturierungsschritt wie in Material und Methoden 3.4.3 beschrieben, wurde der Überstand mit einem 0,2 µm Filter filtriert und auf eine analytische RP18-Säule (Merck Lichrospher 125-4) aufgetragen. Die Trennung erfolgte an einer Sykam HPLC-Anlage. Die Elution erfolgte isokratisch mit 10% Acetonitril (+0,1% TFA) über 12 Minuten bei einer Ofentemperatur von 25 °C. Die Flussrate betrug 1 ml/min, die Detektion erfolgte bei 260 nm.

Retentionszeiten: FAD = 4,9 min; FMN = 6,4 min; Riboflavin = 8,9 min.

Zur quantitativen Bestimmung wurde eine Kalibrierung mit FAD-Standards durchgeführt. Der FAD Standard wurde gravimetrisch erstellt und photometrisch mit dem in der Literatur beschriebenen Extinktionskoeffizienten überprüft.

#### 3.4.6 Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen

##### 3.4.6.1 Eisen Bestimmung mit Ferrospectral

Der Nicht-Häm-Eisen-Gehalt wurde kolorimetrisch durch Bildung eines Ferrozin-Komplexes nachgewiesen<sup>112</sup>. Mit saurer Kaliumpermanganat-Lösung wurde Fe<sup>3+</sup> aus dem Protein gelöst und mit Ascorbinsäure zu Fe<sup>2+</sup> reduziert, um anschließend komplexiert werden zu können.

Die verwendeten Lösungen wurden folgendermaßen frisch angesetzt:

*Lösung A:* 2,25 %ige Kaliumpermanganat-Lösung in 0,6 M HCl

*Lösung B:* 6,5 mM Ferrospectral (3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonat)-1,2,4-Triazin, Dinatriumsalz), 13,1 mM Neocuproin (2,9-Dimethyl-1,10-Phenanthrolin), 2 M Ascorbinsäure und 5 M Ammoniumacetat

Es wurden 200 µl Lösung A mit 400 µl Probe oder Standardlösung (0,1-2 µg Eisen) gemischt und für 2 h bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 40 µl Lösung B versetzt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 562 nm bestimmt. Die Eichgerade wurde mit einer FeCl<sub>3</sub>-Lösung (Sigma, Deisenhofen) erstellt.

#### 3.4.6.2 Eisen Bestimmung mit Ferene

Nachdem das Proteingebundene Eisen durch eine Säure-Behandlung erhalten werden kann, wird durch die Reduktion des Fe<sup>3+</sup> zu Fe<sup>2+</sup> mit Ascorbinsäure eine Komplexierung mit Ferene ermöglicht. Die Bildung eines blauen Farbstoffs kann zur Bestimmung herangezogen werden<sup>113</sup>.

##### *Test Komponenten:*

HCl, 1%

Ammoniumacetat, 7,5%

Natriumdodecylsulfat (SDS), 2,5%

Ascorbinsäure, 4% (m/v) (immer frisch ansetzen)

Eisenchelator 3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(5-sulfo-2-furyl)-1,2,4-triazin, Dinatriumsalz Trihydrat (Ferene), 1,5%

Eisenstandard 0,2 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Mohrs Salz, 0,008%) (immer frisch ansetzen)

##### *Prozedur:*

###### a) Säure-Behandlung

Proteinproben und Eisen-Standard in einem Volumen von 100µl vorlegen (= 2-20 nMol Fe). 100µl 1% HCl zugeben, gut schütteln.

###### b) Inkubation bei 80 °C

Die Eppendorf Cups verschließen und bei 80 °C für 10 Minuten inkubieren.

###### c) Chelatisierung

Folgende Komponenten zugeben, und jedesmal gut vortexen

500µl Ammoniumacetat

100µl Ascorbinsäure

100µl SDS

100µl Ferene

d) Photometrische Bestimmung

Nachdem die Eppendorf Reaktionsgefäße für 5 Minuten bei 9000 x g zentrifugiert worden sind, wird die Absorption bei 593 nm mit Wasser als Blindwert ermittelt.

3.4.7 Bestimmung von säurelabilem Schwefel

Die Eisen-Schwefel-Zentren des Enzyms werden mit Essigsäure hydrolysiert, das freigesetzte Sulfid als Zinksulfid gebunden und mit N,N'-Dimethyl-1,4-phenylen-diammoniumdichlorid in Anwesenheit von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen zu Methylenblau umgesetzt<sup>114</sup>. Methylenblau besitzt ein Absorptionsmaximum bei 670 nm und kann somit photometrisch zur Quantifizierung der Schwefelmenge herangezogen werden. Alle verwendeten Lösungen wurden in quarzdest.  $\text{H}_2\text{O}$  angesetzt. Zur Erstellung einer Eichgerade wurde eine frisch angesetzte  $\text{Na}_2\text{S}$ -Stammlösung eingesetzt, deren Konzentration iodometrisch auf 250 µM geeicht wurde.

*Test Komponenten:*

Lösung A: 2 % Zinkacetat-Lösung

(0,4 g Zinkacetat + 20 µl Eisessig in 20 ml quarzdest.  $\text{H}_2\text{O}$ )

Lösung B: 0,2 % N,N'-Dimethyl-p-phenyldiammoniumchlorid-Lösung in 3,75 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$

20 mg DMPD + 2 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (98 %, suprapur) + 8 ml quarzdest.  $\text{H}_2\text{O}$

Lösung C: 10 %  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$

(2 g  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  + 0,4 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (98 %, suprapur) in

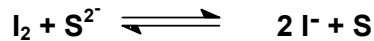
20 ml Quarzdest.  $\text{H}_2\text{O}$ )

Es wurden 100 µl der Probe bzw. des Sulfidstandards (0-25 nMol  $\text{S}^{2-}$ ) in 100 µl der Lösung A langsam hineinpipettiert. Lösung B und Lösung C wurden im Verhältnis von 20:1 gemischt, und davon je 105 µl zum Reaktionsansatz zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz auf 1 ml mit Wasser aufgefüllt und die Absorption bei 670 nm bestimmt.



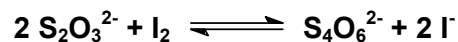
### 3.4.8 Iodometrische Eichung einer Na<sub>2</sub>S -Lösung

Die reversible Reduktion von Iod zu Iodid kann für eine quantitative Bestimmung von S<sup>2-</sup>-Ionen ausgenutzt werden:



Eine I<sub>2</sub>-Lösung in Anwesenheit von Überschuß I<sup>-</sup> enthält Triiodidionen (I<sub>3</sub><sup>-</sup>), die ebenso wie I<sub>2</sub> eine tiefbraune Farbe haben. Bei vollständiger Reduktion des Iods kann man einen deutlichen Farbumschlag ins Farblose beobachten. Die direkte Titration von Na<sub>2</sub>S gegen Iod führt zu schwankenden Werten, da sich ein Teil des S<sup>2-</sup> als H<sub>2</sub>S verflüchtigt. Darum werden die zu eichenden Lösungen in einen Überschuß eingelassen. Na<sub>2</sub>S wurde in überschüssige Iodlösung eingelassen und restliches Iod mit Natriumthiosulfat titriert.

Zur Titration des Iods mit Natriumthiosulfat wird in neutraler bis schwach saurer Lösung das Thiosulfat zum Tetrathionat oxidiert:



Die 0,1 N Iod-Eichlösung wurde zur Kontrolle gegen die 0,1 N Na-Thiosulfat-Eichlösung titriert. Nachdem die Maßlösungen für genau befunden wurden, wurde eine ungefähr 250 µM Na<sub>2</sub>S-Lösung angesetzt, von der 50 - 200 µl in 5 ml Iod-Lösung hineinpipettiert wurde. Das überschüssige Iod wurde mit Na-Thiosulfat titriert. Die Sulfid-Konzentration wurde anhand des weniger verbrauchten Na-Thiosulfats zu Iod berechnet. Die in anaerobem H<sub>2</sub>O Quarzdest. erstellte Eichösung wurde mit einem Stopfen versehen und in der Anaerobenkammer gelagert.

### 3.4.9 Eichung einer Natriumdithionit-Lösung

Natriumdithionit ist ein starkes Reduktionsmittel mit einem Redoxpotential von bis zu -660 mV bei pH 7.0 und 25°C. Das Redoxpotential des Natriumdithionit/(Bi)Sulfid Systems ist konzentrationsabhängig<sup>115</sup>. Die anerobe Oxidation von Natriumdithionit zu (Bi)Sulfid ist in folgender Gleichung gezeigt:



Das Reduktionspotential erhöht sich um 60 mV bei Alkalisierung um eine pH-Einheit. Käufliches Natriumdithionit kann nur bis zu einer Reinheit von ca. 80% erhalten werden. Zudem zeigt Natriumdithionit eine sehr hohe Reaktivität zu Sauerstoff. Die

genaue Bestimmung vorhandener Reduktionsequivalente einer anaeroben Natriumdithionit-Lösung erfolgt photometrisch durch die Titration mit einer Kaliumhexacyanoferrat-Lösung.

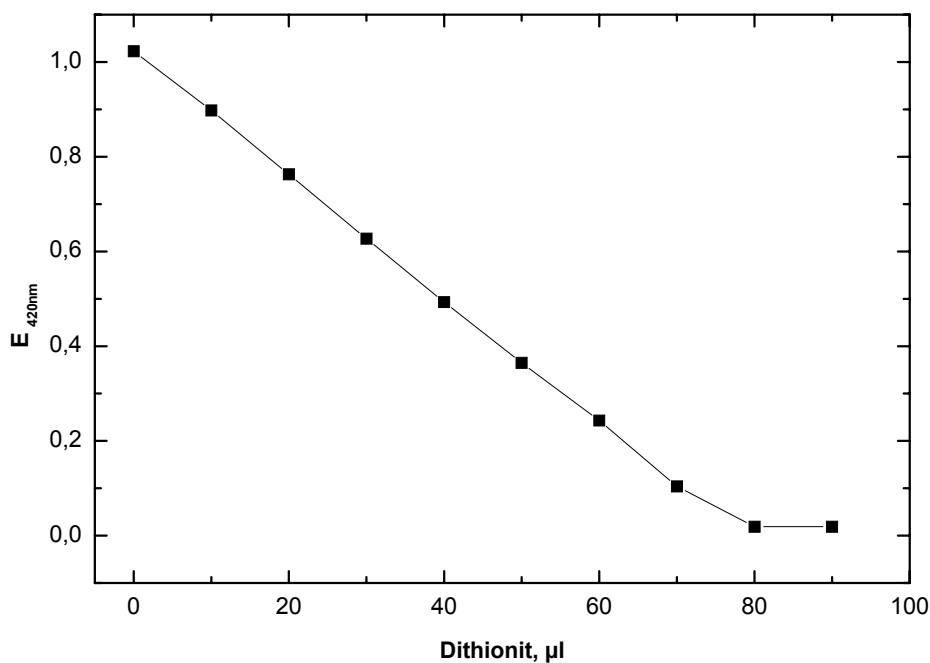
*Test Reagenzien:*

1 mM Kaliumhexacyanoferrat

~20 mM Natriumdithionit-Lösung

*Prozedur:*

Es werden 3 ml einer 1 mM Kaliumhexacyanoferrat-Lösung in einer Plastikküvette vorgelegt. Durch sukzessive Zugabe (10-100  $\mu$ l) der frisch in anaerobem  $H_2O$  angesetzten ca. 20 mM Natriumdithionit-Lösung wird die Kaliumhexacyanoferrat-Lösung titriert und die restliche Absorption bei 420 nm ermittelt. Die genaue Konzentration der Natriumdithionit-Lösung kann aus der Steigung der Ausgleichsgeraden ermittelt werden.



**Abbildung 5: Eichung einer Natriumdithionit-Lösung mit Kaliumhexacyanoferrat.** Eine 1mM Kaliumhexacyanoferrat-Lösung wurde in einer 1ml Küvette, Schichtdicke 1 cm vorgelegt und mit einer ungefähr 20 mM Natriumdithionit-Lösung titriert. Die Absorption bei 420 nm wurde gegen die Menge an zugegebenem Natriumdithionit aufgetragen. Aus der Steigung der Ausgleichsgeraden und dem Extinktionskoeffizienten von Kaliumhexacyanoferrat  $\epsilon_{420nm} = 1,02 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  kann die genaue Konzentration der Natriumdithionit-Lösung errechnet werden.

#### 3.4.10 Photoreduktion mit 5-Deazaflavin

In einem gewöhnlichen Photoreduktionsexperiment<sup>116</sup> für die Erstellung von EPR-Proben wurden jeweils 10 mM EDTA, 20 mM Oxalat oder 100 mM Glycin und 1-50  $\mu$ M 5-Deazaflavin zu der Enzymlösung zugegeben und mit einer Halogen Lampe (250 W) bis zu 60 Minuten bestrahlt. Der Abstand der Lampe (Diaprojektor) betrug ca. 10 cm. Die Konzentration von 5-Deazaflavin wurde photometrisch bestimmt ( $\epsilon_{390\text{nm}} = 12 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Während der Bestrahlung wurde der Ansatz in dem EPR Röhrchen in Eiswasser bei 4 °C gekühlt und unmittelbar nach Beendigung der Photoreduktion mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Durchführung erfolgte im Anaerobenzelt oder unter anaeroben Bedingungen an einer Argon- Begasungsanlage.

#### 3.4.11 HPLC-Analyse von CoA-Derivaten

Zur qualitativen HPLC-Analyse von CoA-Derivaten wurden diese zunächst in filtriertem  $\text{H}_2\text{O}$  (+0,1% TFA) aufgenommen und bei 9000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Trennung erfolgte auf einer RP18-Säule (125-4). Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 10-20% Acetonitril (+0,1% TFA) über 20 Minuten. Die Detektion der CoA-Derivate wurden bei 254 nm durchgeführt.

Retentionszeiten: CoASH = 9,8 min; 4-Hydroxybutyryl-CoA = 12,0 min; Vinylacetyl-CoA = 15,1 min und Crotonyl-CoA 15,5 min.

Die Reinigung verschiedener CoA-Derivate wurde mit einer präparativen RP18-Säule (Merck Lichrospher 250-1) durchgeführt. Die Lösungsmittel entsprechen dem der analytischen Läufe wie zuvor beschrieben. Mit einem linearen Gradienten von 10-20% Acetonitril (+0,1% TFA) und einer Flussrate von 6 ml/min wurden die CoA-Derivate eluiert.

### 3.5 Spektroskopische Methoden

#### 3.5.1 EPR-Spektroskopie

Alle Proben wurden im Anaerobenzelt oder an einer Glasapparatur unter Argon-Begasung in Quarzröhrchen (99,9%) der Quarzschmelze Ilmenau GmbH (Langwiesen), mit einem Innendurchmesser von 3-4 mm und ca. 0,5 mm Wandstärke, gefüllt. Dazu wurden Hamilton Spritzen mit langen Kanülen verwendet. Das Einfrieren und die Lagerung der Proben wurde in flüssigem Stickstoff bei 77 K durchgeführt.

*Messungen und Auswertung:*

Die Aufnahme der EPR-Spektren erfolgte mit den zuvor beschriebenen Spektrometern. Es wurde darauf geachtet, dass die Proben unter nicht sättigenden Mikrowellenleistungen aufgenommen wurden. Die Mikrowellen-Leistung und die Verstärkerstufe (*gain*) wurden aufeinander abgestimmt, um ein bestmögliches Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten. Die Modulationsamplitude wurde je nach Radikalspezies auf einen Wert eingestellt, der nicht zur Übermodulation und damit zum Verlust von spektraler Auflösung führte. Die erhaltenen EPR-Spektren wurden mit dem Programm WINEPR, Version 2.11 (Bruker) ausgewertet.

Die Berechnung des *g*-Faktors ergibt sich aus folgender Resonanzbedingung:

$$h \cdot \nu = g \cdot \beta \cdot H$$

$h = 6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$  (Planck Konstante)

$\beta = 9,274096 \cdot 10^{-24} \text{ J T}^{-1}$  (Bohr Magneton)

$\nu$  = Mikrowellenfrequenz in  $\text{s}^{-1}$

$H$  = Magnetfeld in T

Zur Bestimmung der Spinkonzentration wurde eine Cu(II)-Standardlösung (10 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$  in 2 M  $\text{NaClO}_4$ , 10 mM HCl) benutzt. Der Standard wurde mit nicht sättigender Mikrowellenleistung bei gleicher Temperatur wie die zu quantifizierende Probe gemessen<sup>117,118</sup>. Die Spektren wurden doppelt integriert und mit folgender Gleichung<sup>119</sup> für verschiedene Faktoren, wie Messparameter und probenspezifische Eigenschaften, zu einem vergleichbaren Wert normiert:

$$I_n = (I_0 \cdot d^2 \cdot T \cdot 10^{\text{dB}/20}) / (g_p^{a\nu} \cdot f \cdot a)$$

$I_n$  = Normiertes Doppelintegral

$I_0$  = gemessene Intensität

$d$  = Abstand der Messpunkte (G)

$T$  = Temperatur (K)

dB = Mikrowellenenergie (dB)

$f$  = Röhrchenfaktor

$a$  = Verstärkerstufe

$$g_p^{a\nu} = 2/3 [ (g_x^2 + g_y^2 + g_z^2)/3 ]^{1/2} + [ (g_x + g_y + g_z)/9 ]$$

Die Spinkonzentration für Spin  $\frac{1}{2}$ -Systeme ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$C_u = I_n(u) \cdot C_{st} / I_n(st)$$

$C_u$  = Spinkonzentration der unbekannten Probe

$C_{st}$  = Spinkonzentration des Cu(II)-Standards

$I_n(u)$  = Normierte Intensität der unbekannten Probe

$I_n(st)$  = Normierte Intensität des Cu(II)-Standards

#### *Bestimmung der Mikrowellenleistung-Sättigung ( $P_{1/2}$ )<sup>120</sup>:*

In einem EPR-Experiment wird nicht nur die Wechselwirkung des Elektronenspins mit dem statischen Magnetfeld und der Mikrowellenstrahlung beobachtet, sondern auch die Prozesse, die mit der Abgabe der vom Spinsystem absorbierten Energie an die Umgebung (Gitter) zusammenhängen.

Die Spin-Gitter-Relaxierung ist ein Phänomen, das den Energieaustausch des angeregten Spin-Zustandes mit der Umgebung des Radikals ermöglicht und damit der ständig eingestrahlten Mikrowellenleistung entgegen wirkt. Auch die Spin-Spin-Relaxierung, die alle Vorgänge umfasst, die als Wechselwirkung zwischen den Spins selbst verstanden wird, führt zur Relaxierung des angeregten Spin-Zustandes. Wenn jedoch die Energie des angeregten Zustandes nicht schnell genug an die Umgebung weitergegeben werden kann, führt dies zu einer Zunahme im angeregten Energieniveau der Population und damit zur Aufhebung der Boltzmann-Verteilung. In diesem Fall spricht man von der „Sättigung“ eines EPR-Signals. Das Sättigungsverhalten ist eine wichtige Größe, die zur Charakterisierung des Radikals und seiner Umgebung herangezogen werden kann. Der Mikrowellenleistung-Sättigungswert ( $P_{1/2}$ ) ist definiert als die erforderliche Leistung (mW), die benötigt wird, um die Hälfte des EPR-Signals abzusättigen.

#### *Hochfeld-EPR-Spektroskopie:*

Zur Unterscheidung von sehr ähnlichen freien organischen Radikalen als auch zur besseren Auflösung der g-Faktor-Anisotropie bei Eisen-Schwefel-Zentren wurden EPR-Spektren bei höheren Magnetfeldern (und damit auch höheren Mikrowellenfrequenzen) aufgenommen. Es wurden 140 GHz (erweitertes W-Band) EPR-Spektren mit den zuvor beschriebenen Geräten aufgenommen.

### 3.5.2 ENDOR-Spektroskopie

Bei der Beteiligung vieler Atomkerne an der Hyperfeinstruktur (*Hfs*) des EPR-Signals steigt die Zahl der EPR-Linien multiplikativ mit der Anzahl der *Hfs*-Kerne, was zu einem linienreichen (breiten) und oft nicht mehr aufgelösten EPR-Spektrum führt. Die ENDOR-Spektroskopie ist eine Doppelresonanz-Technik, die zur Auflösung dieser kleinen *Hfs*-Kopplungen eingesetzt werden kann. Hierbei handelt es sich um ein kombiniertes EPR/NMR-Experiment, die eine simultane Einstrahlung von Mikrowellen (GHz) und Radiowellen (MHz) erfordert. Bei diesem Verfahren werden durch hohe Mikrowellenleistung EPR-Übergänge partiell gesättigt und diese Sättigung durch NMR-Übergänge wieder aufgehoben. Bei Variation der NMR-Frequenz (das Magnetfeld  $B_0$  wird dabei auf eine bestimmte Position im EPR-Spektrum fixiert) entstehen Änderungen in der Amplitude der EPR-Linie, die das ENDOR-Spektrum mit der *Hfs*-Information ergeben.

### 3.5.3 Mössbauer-Spektroskopie

Für die Aufnahme von  $^{57}\text{Fe}$  Mössbauer-Spektren wurden zunächst  $^{57}\text{Fe}$  angereicherte *C. aminobutyricum* Zellen gezogen. Zu 10 l des zuvor beschriebenen Kulturmediums wurden 20 mg  $^{57}\text{Fe}$  (35  $\mu\text{M}$ ) zugegeben. Das metallische Eisen wurde bei 60°C in 12 M HCl über Nacht gelöst, bevor es dem Medium zugegeben wurde. Der pH-Wert des Kulturmediums wurde überprüft und bei Bedarf korrigiert. Das Medium wurde mit einer über Nacht gewachsenen Kultur 10 %ig angeimpft und für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die  $^{57}\text{Fe}$ -4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurde nach der zuvor beschriebenen Prozedur gereinigt.

Das Protein wurde in Mössbauer-„Töpfchen“ aus Kunststoff mit einem Volumen von 500  $\mu\text{l}$  befüllt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### *Messungen und Auswertung:*

Im Mössbauer-Experiment wird die Strahlenquelle auf eine bewegliche Apparatur montiert und mit einer veränderbaren Frequenz bewegt. Die Energie des von der Quelle emittierten Photons lässt sich mit Hilfe des Doppler-Effektes kontrollieren. Veränderungen der Frequenz resultieren in einer veränderten Energie des Photons. Oft kann schon eine geringe Geschwindigkeit von wenigen mm/s zur Absorption führen. Zwei Parameter des Mössbauer-Spektrums geben Informationen über den Eisen-Kern preis: Die Isomerieverschiebung ( $\delta$ ) und die Quadrupolaufspaltung ( $\Delta E_Q$ ).

Die Isomerieverschiebung beruht auf unterschiedlichen Kernradien von Grundzustand und angeregtem Zustand. Da der Beitrag der s-Orbitale zur Elektronendichte in der unmittelbaren Umgebung des Kerns in diesen Parameter einfließt, ist er ein direktes Maß für den Oxidationszustand des Fe-Atoms. Die Quadrupolaufspaltung beruht darauf, dass der angeregte  $^{57}\text{Fe}$ -Kern im Gegensatz zum Grundzustand aufgrund eines veränderten Kernspins eine Quadrupolsymmetrie besitzt. Dies verändert die Energie des Kerns je nach Symmetrie der Umgebung. In einer oktaedrischen Umgebung hängt die Energie des Kerns nicht von der Orientierung ab, während dies bei axialer Symmetrie der Fall ist. Das Quadrupolmoment gibt also Auskunft über die Symmetrie der Elektronenverteilung in der Nähe des aktiven Kerns.

### 3.6 Elektrochemische Methoden

Das Redoxpotential ist der wichtigste Parameter zur Charakterisierung von redoxaktiven Spezies. Sie wird durch die Nernst-Gleichung beschrieben, die die reversible Reduktion einer oxidiert vorliegenden Spezies (ox) durch  $n$  Elektronen



und die Beziehung zwischen der Konzentration der oxidierten (ox) und reduzierten (red) Spezies und dem Potential der Lösung  $E$  beschreibt:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \cdot \ln\left(\frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]}\right)$$

$F$  = Faradaykonstante 96485,34 J/mol x Volt (Ladung pro Mol Elektronen)

$R$  = ideale Gaskonstante 8,3144 J/mol K

$T$  = absolute Temperatur in K

Unter Standardbedingungen ( $T = 25\text{ °C}$ ,  $\text{pH } 7$ ,  $p = \text{const}$ ), ist das Potential  $E^0$  an welchem  $[\text{Red}] = [\text{Ox}]$  ist, das Standard-Redoxpotential, ein direktes Maß für die freie Standard-Enthalpie der Redoxreaktion:

$$\Delta G_0' = -n F E^0$$

Das bedeutet, dass die Reduktion einer Substanz durch eine andere dann begünstigt ist, wenn das Reduktionspotential niedrig (ins negative) und die Konzentration an reduzierter Spezies hoch ist. Wegen der direkten Beziehung zwischen dem Potential und der Energiedifferenz zwischen oxidiertem und reduziertem Zustand können die Gegenwart von Ladungen in der Nähe des Redoxzentrums,

Wasserstoffbrückenbindungen oder die Polarität/Ionenstärke des umgebenden Peptid-/Solvensmediums einen großen Einfluß auf das Redoxpotential haben. Auch eine protonierbare oder deprotonierbare Gruppe am oder in der Nähe des redoxaktiven Zentrums kann das Redoxpotential beeinflussen und es somit pH-abhängig machen. Redoxpotentiale werden bestimmt durch die Ermittlung desjenigen Potentials, bei dem oxidierte und reduzierte Spezies in gleicher Konzentration vorliegen. Hierzu bedient man sich stationärer und dynamischer Verfahren.

### 3.6.1 Redox titrationen

#### 3.6.1.1 Redox titration verfolgt mittels EPR-Spektroskopie

Die klassische Redox titration ist ein stationäres Verfahren zur Bestimmung des Redoxpotentials einer redoxaktiven Spezies. Durch die Zugabe von Oxidations- bzw. Reduktionsmitteln oder durch direkte Oxidation/Reduktion mittels einer geeigneten Elektrode kann ein definiertes Potential der Lösung und damit auch der Probe eingestellt werden. Die Bestimmung des Potentials erfolgt mit zwei Elektroden, einer Platin-Elektrode und einer Ag/AgCl bzw. Hg/HgCl Referenzelektrode, die in die Proteinelösung eingetaucht wird. Damit das Potential der Lösung dem des Potentials in der Probe entspricht, muss die Lösung ständig gerührt oder lange equilibriert werden. Um eine möglichst schnelle und homogene Equilibrierung zu erhalten, werden Mediatoren verwendet. Mediatoren sind niedermolekulare Redoxsysteme, die ein- oder zwei Elektronen aufnehmen bzw. abgeben können. Das Verhältnis von oxidiert zu reduzierter Spezies wird hierbei häufig auf spektroskopischem Wege ermittelt.

Zur Bestimmung des Redoxpotentials mittels EPR-Spektroskopie wurde eine Apparatur nach Wilson und Dutton verwendet<sup>121</sup>. In einer gewöhnlichen Titration wurden ca. 3-5 ml 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in der Gegenwart der aufgelisteten Mediatoren (Tabelle 5) mit Natriumdithionit und Kaliumhexacyanoferrat titriert. Das Potential wurde mit einer Ingold Pt 4805-S7/120 Platinelektrode ermittelt. Um das Standard Wasserstoffpotential (SHE) zu erhalten, wurde das Potential der Ag/AgCl-Referenzelektrode von +197 mV miteinberechnet. Nachdem das gewünschte Potential eingestellt war, wurden jeweils 200 µl-Proben entnommen, in kalibrierte EPR-Röhrchen gefüllt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die EPR Messungen erfolgten wie in Material und Methoden beschrieben. Die Signalintensitäten wurden normiert und gegen das Potential aufgetragen. Die Daten wurden mit den Programmen Kaleidagraph® oder Origin® mit der Nernst-Gleichung ausgewertet.

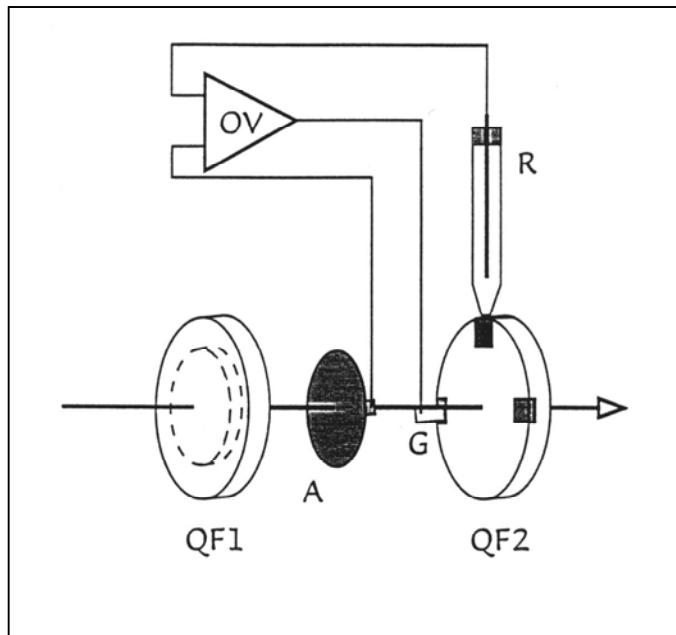


**Tabelle 5: Liste der verwendeten Mediatoren.**

Mediator	Abk.	löslich in	$E_m$ [mV]
1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridyliumdichlorid (Methylviologen)	MV	Wasser	-449
1,1'-Dibenzyl-4,4'-bipyridyliumdichlorid (Benzylviologen)	BV	Wasser	-358
Antrachinon-2-sulfonat	ANSO	DMSO	-225
Antrachinon-2,6-disulfonat	A2,6	Wasser	-184
2-Hydroxy-1,4-naphtochinon	HNQ	Ethanol	-152
Menadion	MN	Ethanol	-13
2-Methyl-1,4-naphtochinon			
Durochinon	DQ	Ethanol	+5
Tetramethyl-p-benzochinon			
Phenazin-ethosulfat	PES	Wasser	+55
Phenazin-methosulfat	PMS	Wasser	+80
Trimethyl-1,4-benzochinon	TMQ	Ethanol	+99
1,2-Naphtochinon	NQ	DMSO	+144
2,6-Dichlorophenol-indophenol	DCPIP	Wasser	+217
N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin	TMPD	Ethanol	+276
Kaliumhexacyanoferrat	FeCy	Wasser	+408
Ferrocen-1,1'-dicarbonsäure	FD	DMSO	+530

### 3.6.1.2 Redox Titration verfolgt mittels CD-Spektroskopie

Zur Bestimmung von Redoxpotentialen wurde eine weitere stationäre Methode verwendet. Dazu wurde die Titration in einer optisch transparenten Dünnschichtzelle (OTTLE-Zelle) durchgeführt und mit Hilfe von CD-Spektroskopie verfolgt (Abbildung 6). Eine Drei-Elektrodenanordnung, bestehend aus Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode ermöglicht die Reduktion bzw. Oxidation der Probe auf elektrochemischem Wege.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der OTTLE-Zelle.** A, Arbeitselektrode; G, Gegenelektrode; R, Referenzelektrode; QF1 und QF2, Quarzfenster und OV, Operationsverstärker. Der Pfeil kennzeichnet die Richtung des Messstrahls (aus<sup>35</sup>)

Die Arbeitselektrode ist eine transparente Goldelektrode, die aus einem Pyridin-3-carboxyaldehyd-thiosemicarbazon (PATs) modifizierten Goldnetz mit einer Maschengröße von ca. 80 Drähten/cm und einer Transmission von 78% (Buckbee & Mears, St. Paul) besteht. Die Platinblech-Gegenelektrode und eine miniaturisierte Ag/AgCl/KCl Referenzelektrode sind am Rand der Quarzfenster in Kontakt mit der Probenlösung. Der elektrische Kontakt zur Goldnetz- und Platinblechelektrode wurde mit elektrisch leitendem Silberlack (RS Components, Mörfelden) hergestellt. Das Potential der Mikroreferenzelektrode wurde gegen eine gesättigte Standard Ag/AgCl Elektrode (Radiometer, Kopenhagen) kalibriert. Das Potential zwischen Referenz- und Arbeitselektrode wurde über einen Wenking MP 87 Potentiostaten (Bank Elektronik, Clausthal) eingestellt und geregelt. Zur Beschleunigung der Einstellung des Redoxgleichgewichts wurden Mediatoren verwendet (Tabelle 5).

*Auswertung der Redoxtitrationen:*

Die Signalintensitäten wurden normiert und gegen die Potentiale aufgetragen und mit der Nernst-Gleichung ausgewertet. Dafür wurden die Programme KaleidaGraph und Origin verwendet.

Die relevanten Gleichungen die aus der Nernst-Gleichung abgeleitet wurden und das Verhalten der Signalintensität der oxidierten bzw. reduzierten Spezies beschreiben sind:

$$E = E^0 + RT/nF \cdot \ln([Ox]/[Red])$$

$$[Ox] + [Red] = 1 \rightleftharpoons [Red] = 1 - [Ox]$$

A) Für den Fall, dass die oxidierte Redox-Spezies ein Signal zeigt:

$$[Ox] = 1 / (1 + \exp [nF \cdot (E_0 - E) / RT])$$

In KaleidaGraph lautet die Gleichung:

$$y = m3 / (1 + \exp[(m1 / 25.693) \cdot (m2 - M0)])$$

B) Für den Fall, dass die reduzierte Redox-Spezies ein Signal zeigt:

$$[Red] = 1 / (1 + \exp [nF \cdot (-E_0 + E) / RT])$$

In KaleidaGraph lautet die Gleichung:

$$y = m3 / (1 + \exp[(m1 / 25.693) \cdot (M0 - m2)])$$

C) Für den Fall, dass die Redox-Spezies in der Lage ist, einen intermediären Redoxzustand anzunehmen, der maximale Signalintensität aufweist und bei weitergehender Reduktion oder Oxidation zur Disproportionierung und damit zu einer Signalabnahme führt, lautet die Gleichung in KaleidaGraph:

$$y = m3 / (1 + \exp[(m1 / 25.693) \cdot (m2 - M0)] + \exp[(m1 / 25.693) \cdot (M0 - m4)])$$

m1 = Anzahl der Elektronen die involviert sind (1-2)

m2 = Erstes Redoxpotential in mV

m3 = Signalintensität, normiert auf eins

m4 = Zweites Redoxpotential einer Redox Spezies mit drei Redox Stufen

M0 = Eingestelltes Potential während der Titration

Die Potentialdifferenz zweier Halbpotentiale eines Redoxsystems erlaubt die Berechnung des prozentualen Anteils der Zwischenstufe (z.B. Flavin Semichinon). Es

gibt eine direkte Korrelation der Gleichgewichtskonstante ( $K$ ) mit der Potentialtrennung der beiden Halbreaktionen:

$$\% \text{ (Zwischenstufe)} = K^{1/2} / (2 + K^{1/2}) \quad \Delta = 60 \text{ mV} \times \ln K$$

$K$  = Gleichgewichtskonstante

$\Delta$  = Potentialunterschied zwischen den Halbpotentialen (mV)

### 3.6.2 Cyclovoltammetrie

Die cyclische Voltammetrie ist eine weitere Methode zur Bestimmung des Redoxpotentials<sup>122</sup>. Das Cyclovoltammogramm gibt hierbei nicht nur Einblick in thermodynamische Parameter wie das Redoxpotential, sondern auch unmittelbar in die Kinetik von Elektrodenreaktionen, die sowohl die heterogenen und homogenen Elektronentransferschritte als auch angekoppelte chemische Reaktionen umfassen. Diese dynamische Methode beruht darauf, dass ebenfalls in einer Drei-Elektrodenanordnung das Potential durch Vorgabe einer Dreiecksspannung zwischen zwei Endpunkten mit einer bestimmten Vorschubgeschwindigkeit hin- und hergeführt wird. Gemessen wird in dieser Anordnung der Stromfluss zwischen Arbeits- und Gegenelektrode in Abhängigkeit des Potentials. Befindet sich das Redoxpotential der Probe im voltammetrisch erfassten Bereich, fließt über die Elektrode ein Faradayscher Strom. Dieser Strom wird bestimmt durch die Diffusion der Reaktionspartner zur Elektrodenoberfläche und der Ladungsdurchtritts-Reaktion. Durch Reaktion an der Elektrodenoberfläche tritt gegenüber dem Lösungsmittellinneren eine Verarmung der redox-aktiven Substanz auf, die zur Ausbildung eines Konzentrationsgradienten führt. Dieser Konzentrationsgradient bestimmt, dem Fick'schen Gesetz folgend, den Stofftransport zur Elektrode und damit den Diffusionsstrom. Es kommt jeweils in Oxidations- und Reduktionsrichtung zur Ausbildung eines Stromextremums umgekehrten Vorzeichens. Auf der Potentialachse sind diese beiden Extrema durch  $(60/n)$  mV voneinander getrennt. Die Ablesung des Redoxpotentials erfolgt dort, wo der Mittelpunkt, ausgehend von beiden Extrema, sich befindet. Die maximale Stromhöhe wird hierbei für ein ideales und reversibles System durch die Randles-Sevcik-Gleichung beschrieben:

$$i_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot \nu^{1/2} \cdot c$$

$i_p$  = Strommaximum [A]

$A$  = Elektrodenoberfläche [cm<sup>2</sup>]

$D$  = Diffusionskoeffizient [cm<sup>2</sup>/s]

$c$  = Konzentration [M]

$v$  = Potentialvorschubgeschwindigkeit [V/s]

Anhand dieser Beziehung wird ersichtlich, dass die maximale Stromhöhe linear von der Wurzel der Vorschubgeschwindigkeit  $v$  abhängig ist. Für wasserlösliche Proteine mit Molekularmassen von 10 kDa beträgt der Diffusionskoeffizient ca.  $10^{-6}$  cm<sup>2</sup>/s. Für die cyclische Voltammetrie wurde ein Aufbau analog der Apparatur von Hagen<sup>104</sup> mit einer von Protein benetzten Elektrodenoberfläche von ca. 0,04 cm<sup>2</sup> gewählt (Abbildung 7). Bei einer Proteinkonzentration von ca. 500  $\mu$ M und einer Vorschubgeschwindigkeit von beispielsweise 10 mV/s errechnet sich aus der Randles-Sevcik-Gleichung ein Strommaximum von ca. 0,5  $\mu$ A. Bei Proteinen wird jedoch häufig beobachtet, dass die Ladungsdurchtritts-Reaktion, die in der obigen Gleichung als sehr schnell angenommen worden ist, geschwindigkeitsbestimmend wird; die Ladungsdurchtritts-Reaktion ist gehemmt. Dies führt zu einer Abweichung vom idealen Verhalten. So beträgt in diesen Fällen die Separation zwischen Oxidations- und Reduktionsextremum mehr als  $(60/n)$  mV. Aus dieser Abweichung lässt sich die heterogene Elektronentransferrate bestimmen.

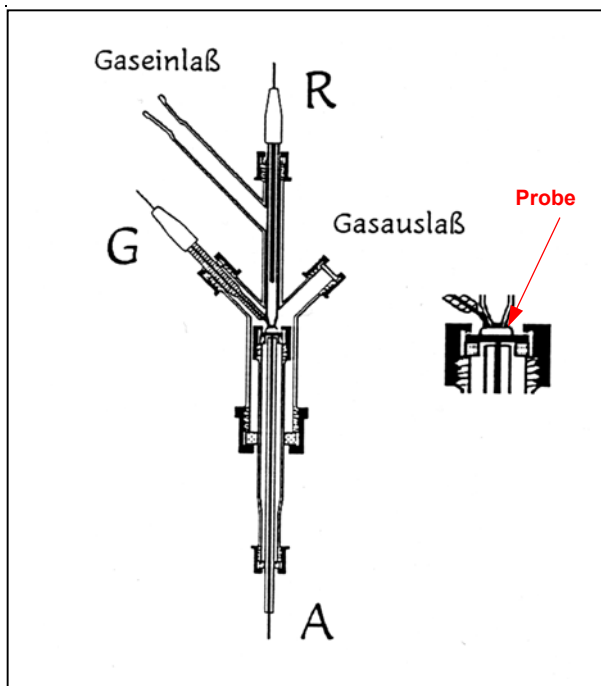
$$k^0 = \psi \cdot [D\pi v \cdot (nF/RT)]^{1/2}$$

$k^0$  = heterogene Elektronentransferrate [cm/s]

$\psi$  = kinetischer Parameter (dimensionslos)

$D$  = Diffusionskoeffizient [cm<sup>2</sup>/s]

$v$  = Potentialvorschubgeschwindigkeit [V/s]



**Abbildung 7. Apparatur für cyclische Voltammetrie (aus <sup>104</sup>).** A, Arbeitselektrode; G, Gegenelektrode und R, Referenzelektrode.

Durch die Separation der Stromextrema in Abhängigkeit der Potentialvorschubgeschwindigkeit lässt sich aus Tabellenwerken der Parameter  $\psi$  ermitteln und damit die heterogene Elektronentransferrate berechnen. Wenn ein digital kontrollierter Potentiostat verwendet wird, erfolgt die zeitabhängige Einstellung des Potentials durch eine Serie von kleinen Stufen. Daraus resultiert ein sogenanntes „Square Wave Voltammogramm“ (SQV). Durch die Wahl geeigneter Parameter für das Stufenpotential und der Frequenz, bei welcher ein Datenpunkt aufgenommen wird, ist es möglich, eine größere Auflösung zu erreichen, die zu symmetrischen Voltammogrammen führt, obwohl es sich um diffusionskontrollierte Spezies handelt. In diesem Fall kann das Potential unmittelbar von der Position der maximalen Signalintensität abgelesen werden.

Für die Reaktion von Proteinen mit der Elektrodenoberfläche ist fast immer eine auf das jeweilige Protein abgestimmte Vorbehandlung der Elektrodenoberfläche und Auswahl des geeigneten Elektrodenmaterials notwendig. Die Schwierigkeit besteht in diesem Zusammenhang darin, dass das Redoxzentrum des Proteins möglicherweise nur schwer zugänglich ist oder das Protein dazu neigt, auf der Elektrodenoberfläche zu denaturieren. Diese Probleme versucht man zu umgehen, indem man die Elektrodenoberfläche modifiziert. Diese Modifikationen erlauben eine quasi-Adsorption und damit einen verbesserten Elektronentransfer des Proteins. Zudem wird einer

Denaturierung vorgebeugt. In der Regel können meistens nur Proteine mit kleinen Molekularen Massen und solche die Elektronentransferfunktionen erfüllen (z.B. Ferredoxin oder Flavodoxin) mit der cyclischen Voltammetrie untersucht werden.

#### *Probenvorbereitung:*

Die elektrochemische Charakterisierung der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase erfolgte an einer Glaskohlenstoffelektrode oder Goldelektrode in der Gegenwart von 200 µg/ml Polymyxin, welches als Koadsorbant zugesetzt werden musste. Die Aktivierung der Glaskohlenstoffelektrode wurde durch Aufkochen in konzentrierter Salpetersäure für 10 Minuten erreicht. Dadurch werden auf der Oberfläche Carbonylgruppen aufgebracht, die die Reaktion mit dem Protein vermitteln sollen. Nach einer intensiven Waschprozedur wurde die Elektrode poliert, gewaschen und in dieser Form in die Apparatur eingebaut. Die Apparatur wurde vor Beginn der Messungen zunächst ca. 1 Stunde mit Argon geflutet und auch während der Messungen ständig unter Argon-Atmosphäre gehalten.

In einem gewöhnlichen CV-Experiment wurde mit Polymyxin versetzte 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (0,5 – 1 mM) unter anaeroben Bedingungen in einem Volumen von 12 µl mit einer Hamilton Spritze auf die Oberfläche der Arbeitselektrode aufgetragen. Der Enzym-"Tropfen" wurde so aufgebracht, dass zu allen drei Elektroden ein Kontakt bestand.

### **3.7 Synthesen**

#### **3.7.1 Synthese von Fettsäure-CoA-Derivaten**

Die Sulfhydryl-Gruppe des Coenzym A kann im alkalischen Milieu durch nukleophilen Angriff am Carbonyl-Kohlenstoff verschiedener Fettsäureanhydride das jeweilige CoA-Derivat und die freie Fettsäure bilden<sup>123</sup>. 30 mg Coenzym A werden in 1,0 ml H<sub>2</sub>O dest. gelöst, mit 20 mg KHCO<sub>3</sub> auf pH 8,0 abgepuffert und mit einem Überschuß an Acetanhydrid versehen. Zur Herstellung von Crotonyl-CoA wurde Crotonsäureanhydrid eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur, solange bis mit dem Ellmanns-Reagenz (DTNB, 20 mg/ml) keine Gelbfärbung, d.h. keine freien SH-Gruppen, mehr zu erkennen war<sup>124</sup>. Der Ansatz wurde mit 7,7 M HCl auf pH 2-3 angesäuert und im Rotationsverdampfer (Heidolph) bei 30 °C bis zur Trockene eingengt. Hierbei wird verbliebenes Anhydrid und Crotonat entfernt. Dieser Schritt kann auch mittels Lyophilisation durchgeführt werden. Danach wurde noch zweimal mit

jeweils 1 ml H<sub>2</sub>O dest. aufgenommen und erneut eingengt. Das Salz wurde in H<sub>2</sub>O gelöst, der pH auf 6,0 eingestellt und bei -20 °C gelagert. Die Konzentration wurde mit enzymatischer Endpunktsbestimmung ermittelt.

### 3.7.2 Synthese von 4-Hydroxy[3-<sup>2</sup>H]butyrat

Die Deuterierung am C-3 des 4-Hydroxybutyrat kann über die Keto-Enol-Tautomerie des Succinatsemialdehyd erfolgen<sup>10</sup>. Die Aldehyd-Gruppe des Succinatsemialdehyd steht im Gleichgewicht mit dem Enol und erlaubt somit den Austausch von Protonen des C-3 mit dem Lösungsmittel. Anschließend kann durch Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> 4-Hydroxybutyrat hergestellt werden.

Hierzu wurde 300 µl käufliche Succinatsemialdehydlösung (1,47 M) mit 440 µl 1 M NaHCO<sub>3</sub> neutralisiert. Der Ansatz wurde im Rotationsverdampfer eingengt, in 400 µl D<sub>2</sub>O (Sigma, 99,9% D) gelöst und nochmal eingengt. Nach wiederholtem Einengen wurde die zähe Flüssigkeit in 500 µl D<sub>2</sub>O und 5 µl Tritiumwasser (100 mCi/ml) aufgenommen und mit 20 µl 12 M DCl (Sigma, 99,9% D) angesäuert. In einem verschließbaren Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde der Ansatz für 16 Stunden bei 95 °C in einem Heizblock erhitzt. Die Reduktion erfolgte in einer 0,4 M NaBH<sub>4</sub> gelöst in 0,2 M NaOH. Dazu wurde die Probe langsam zu 2 ml NaBH<sub>4</sub>-Lösung hinzugefügt und für 1 Stunde bei 25°C inkubiert. Restliches NaBH<sub>4</sub> wurde durch die Zugabe von 300 µl Formaldehyd (37%ig) oxidiert. In dieser exothermen Reaktion wird H<sub>2</sub>-Gas freigesetzt. Durch die Zugabe von wenigen Tropfen 1 M HCl und Abwesenheit weiterer H<sub>2</sub>-Gasbildung kann überprüft werden ob das gesamte NaBH<sub>4</sub> zerstört worden ist. Die Reinigung der 4-Hydroxybuttersäure wurde mit einer Dowex 1-X8 Anionenaustauscher-Säule (1,0 x 10 cm) durchgeführt. Die Probe wurde auf 10 ml verdünnt, neutralisiert auf pH 7 und langsam aufgetragen. Nachdem die Säule mit 25 ml H<sub>2</sub>O dest. gespült worden ist, wurde mit einem Gradienten-Mischer ein linearer Gradient von 0 bis 1 M HCl über ein Volumen von 100 ml angelegt. Es wurden 2 ml-Fractionen gesammelt, von denen jeweils 50 µl in Szintillationsgefäße überführt wurden. Pro Szintillationsgefäß wurden 3 ml Szintillationsflüssigkeit (AqualumaR) zugesetzt, bevor in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (1900 CA Tri-CarbR, Packard) auf β-Strahlung detektiert wurde. Die ersten Fractionen enthielten das überschüssige Tritiumwasser. In den Fractionen 18 bis 27 eluierte markiertes 4-Hydroxybutyrat als symmetrischer Peak. Die Fractionen des Peaks wurden vereinigt



und nach Neutralisation mit  $\text{KHCO}_3$  lyophilisiert (Modulyo, Edwards), danach in jeweils 2 ml  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst und mit NMR-Spektroskopie auf die Umsetzung überprüft.

Die Konzentration des 4-Hydroxy[3- $^2\text{H}$ ]butyrat wurde mit dem zuvor beschriebenen enzymatischen Test ermittelt.

### 3.7.3 Synthese von 4-Hydroxy[2- $^2\text{H}$ ]butyrat

Bei hohen Temperaturen und sehr niedrigem pH-Wert kann die Carboxy-Gruppe des 4-Hydroxybutyrat einen Protonen-Austausch am  $\alpha$ -Kohlenstoff mit dem Lösungsmittel ermöglichen<sup>100</sup>. Da bei diesen Bedingungen ebenfalls die Bildung von  $\gamma$ -Butyrolacton begünstigt wird, liegt ein Teil des umzusetzenden Substrats in dieser Form vor.

Es wurde eine 2 M Na-4-Hydroxybutyrat-Lösung in 6 M DCl angesetzt und für 36 h in einem verschließbaren Sorvirel-Röhrchen bei 180 °C im Trockenschrank erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz neutralisiert und mit NMR-Spektroskopie auf Umsetzung überprüft. Das bei der Neutralisation ausgefallene NaCl wurde zuvor mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert.  $\gamma$ -Butyrolacton wurde durch Alkalisierung des Mediums mit 10 M NaOH auf pH 12 und 45 minütige Inkubation bei 100 °C wieder zu 4-Hydroxy[2- $^2\text{H}$ ]butyrat umgewandelt.

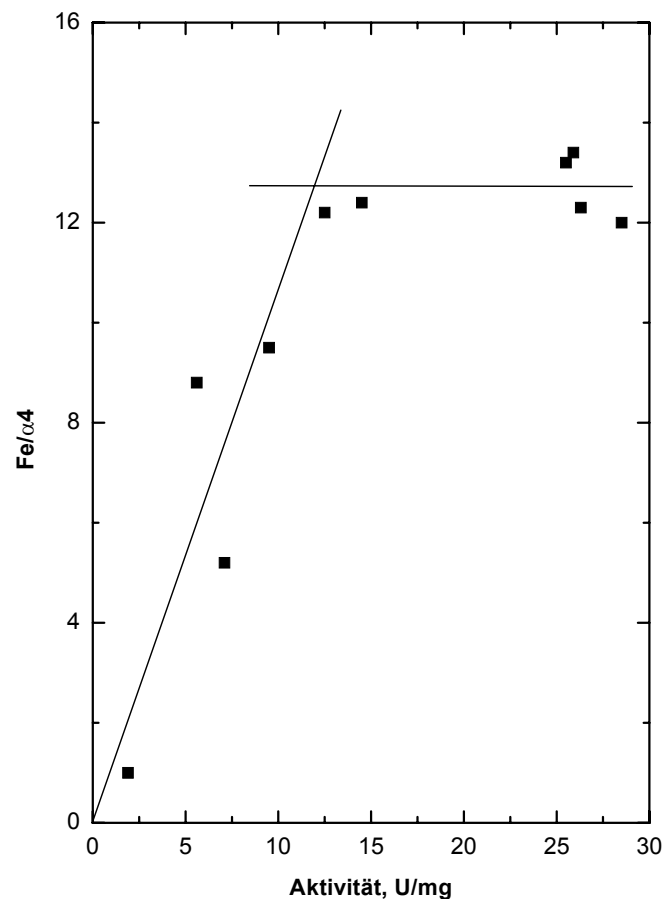
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Zusammensetzung und spektroskopische Eigenschaften der Kofaktoren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

#### 4.1.1 Gehalt an Eisen, FAD und Bestimmung der spezifischen Aktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

Bisher publizierte Werte für den Eisengehalt und die spezifische Aktivität zeigten große Variationen. Es wurden 8-16 mol Eisen sowie 2 FAD pro mol Homotetramer beschrieben<sup>11,91</sup>. Die spezifische Aktivität wurde je nach Präparation mit 2 – 16,7 U/mg angegeben. Der Enzymtest, der auf der Oxidation des aus dem Produkt Crotonyl-CoA gebildeten 3-Hydroxybutyryl-CoA beruht, konnte durch den Zusatz der Hilfsenzyme Thiolase und Phosphat-Acetyltransferase verbessert werden. Dadurch wird das Gleichgewicht schon bei pH 7 und nicht erst bei pH 9 in Richtung NADH-Bildung verschoben. Mit diesem neuen Test konnten Aktivitäten bis zu 33,5 U/mg gemessen werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Dehydratase-Reinigungen führten zu ähnlichen Variationen im Eisengehalt als auch in der spezifischen Aktivität (Abbildung 8). Besonders aktive Präparationen (>12 U/mg) zeigen einen höheren Eisen-Gehalt (12,0 - 13,4 Fe/ Homotetramer,  $\alpha_4$ ). Präparationen mit hoher Aktivität wurden in der Regel nur dann erhalten, wenn die Chromatographie-Puffer mehrere Tage im Anaerobenzelt gerührt, die Chromatographie-Säulen ca. 12 Stunden in diesen Puffern gelagert und die gesamte Reinigungsprozedur auf 24 Stunden begrenzt wurde. Es handelt sich hierbei um repräsentative Reinigungen in einem Zeitraum von zwei Jahren, die z.T. mit unterschiedlichen Fermenter-Ernten durchgeführt wurden. Zudem wurde nicht immer auf die oben genannten Maßnahmen für eine strikt anaerobe Reinigungsprozedur geachtet, so dass eine lineare Abhängigkeit der Aktivität von dem Eisengehalt bis zu einem Eisengehalt von 12 Fe/ Homotetramer beobachtet werden konnte. Präparationen mit höheren Aktivitäten zeigten jedoch nicht mehr als 12 Fe/ $\alpha_4$ . Dieser Befund deutet auf eine zweite Komponente hin, die zusammen mit dem Eisengehalt die Aktivität des Enzyms bestimmt. Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um den FAD-Gehalt. In besonders aktiven 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase Präparationen wurden bis zu 4 FAD/ $\alpha_4$  nachgewiesen. Demnach kann durch die Reinigungsprozedur der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase der Verlust von FAD als auch der Zerfall der  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren verursacht sein. Unter optimalen Bedingungen wäre wohl die Existenz von einem FAD und einem  $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentrum pro Untereinheit zu erwarten. Sauerstoff-Exposition der Dehydratase führt zum Verlust der

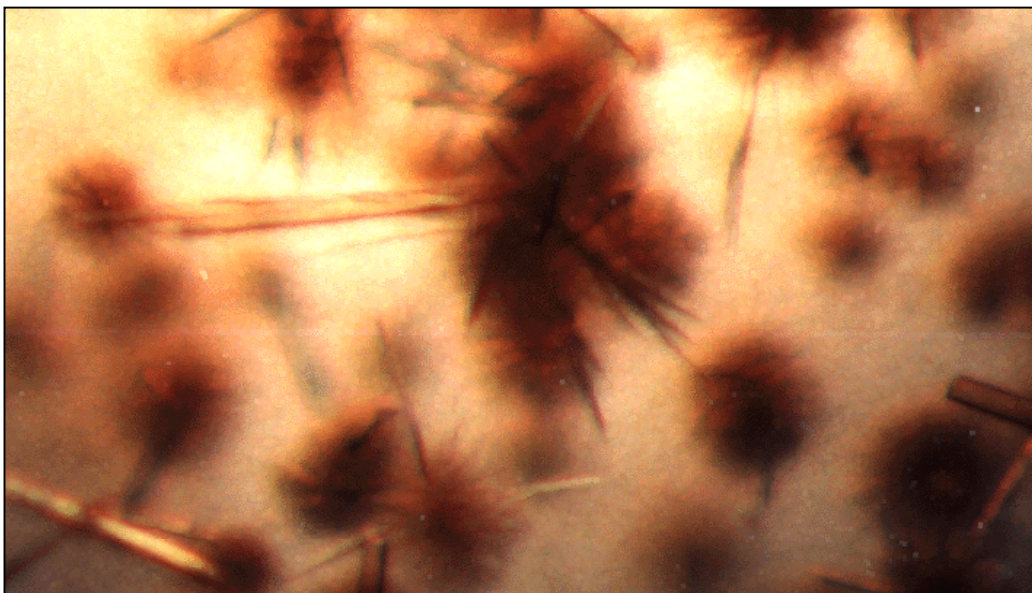
Eisen-Schwefel-Zentren<sup>100</sup>. In dieser Arbeit konnte mittels Gelfiltrationsexperimenten auch der Verlust des FAD Kofaktors nach Sauerstoff Exposition der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nachgewiesen werden. Während anaerob gehaltene Präparationen keine FAD-Abtrennung auf einer Sephadex-G25 Gefiltrationssäule zeigten, wurden in Luftsauerstoff-exponierten Proben die Ablösung des FAD Kofaktors vom Holoenzym beobachtet.



**Abbildung 8: Korrelation der spezifischen Aktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit dem Eisengehalt.** Die spezifische Aktivität wurde gegen den Eisen-Gehalt aufgetragen.

Auch in Kristallisationsansätzen der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase konnte der Einfluss von Sauerstoff auf die Kofaktoren beobachtet werden. Aerobe Kristallisationsansätze führten bereits nach einigen Tagen zu einem hell-gelben Proteinpräzipitat, wohingegen unter anaeroben Bedingungen über einen Zeitraum von Monaten keine Proteinpräzipitation bei gleicher Pufferzusammensetzung beobachtet wurde. Die Kristallisation der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase konnte unter strikt anaeroben Bedingungen erfolgreich durchgeführt werden. Es wurde ausschließlich die Hanging-drop Methode verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 18 °C im Anaerobenzelt.

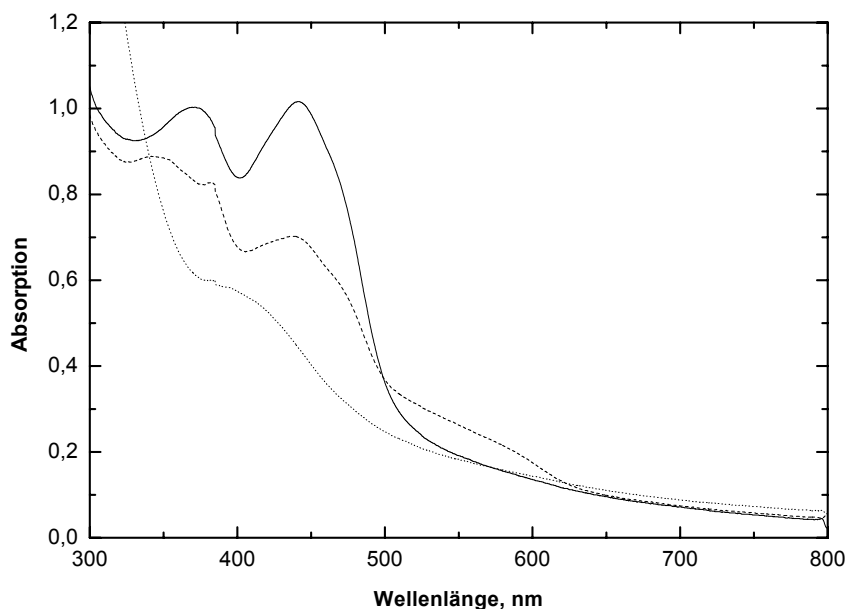
Erstmals konnten braungefärbte Kristalle gezüchtet werden, die innerhalb von drei Tagen gebildet wurden. Die besten Kristalle wurden in einer Mutterlauge aus 100 mM Natriumacetatpuffer pH 4,6, 200 mM Ammoniumacetat, 30% w/v PEG 4000 und in Gegenwart von Crotonyl-CoA, erhalten (Abbildung 9). Sauerstoffkontakt führte bereits nach einigen Stunden zur Zerstörung der Kristalle. Die braune Farbe der Kristalle als auch die Färbung mit Coomassie Farbstoff gaben Hinweise auf die Existenz von echten Proteinkristallen. Da aber die Kristalle zu klein für die Aufnahme eines Diffraktion-Datensatzes waren, bedarf es einer Optimierung der Kristallanzucht um größere Kristalle erhalten zu können. Zu diesem Zweck wurde das Projekt an die Arbeitsgruppe von Prof. Messerschmidt, MPI für Biochemie Martinsried abgegeben. Die Aufnahme eines ersten Diffraktion-Datensatzes durch Berta Martins führte zu einer Auflösung von 3-4 Angström (persönliche Mitteilung).



**Abbildung 9: Kristallisation der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Crotonyl-CoA unter anaeroben Bedingungen.** Die Mutterlauge setzt sich zusammen aus 100 mM Natriumacetatpuffer pH 4,6, 200 mM Ammoniumacetat, 30% w/v PEG 4000. Die Proteinlösung lag vor in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4, 2 mM DTT, Proteinkonzentration 10 mg/ml und 25 mM Crotonyl-CoA.

#### 4.1.2 Elektronenaufnahmekapazität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

Die spektralen Eigenschaften der Dehydratase im UV-Vis erlauben eine Identifizierung der verschiedenen Redoxzustufen des FAD und der Eisen-Schwefel-Zentren. In Abbildung 10 sind die UV-Vis Spektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in den drei möglichen Redoxstufen des FAD gezeigt. Die oxidiert vorliegende 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase zeigt ein typisches Absorptionsspektrum für das FAD-Benzochinon mit Absorptionsmaxima bei 370 nm und 442 nm. Bei der zusätzlich vorhandenen Absorption im höheren Wellenlängenbereich (500 – 800 nm), handelt es sich um eine sogenannte „Charge-Transfer-Bande“, die sowohl für Eisen-Schwefel-Zentren als auch bei Flavin-Substrat-Ladungsinteraktionen beschrieben wurde<sup>22,125</sup>.

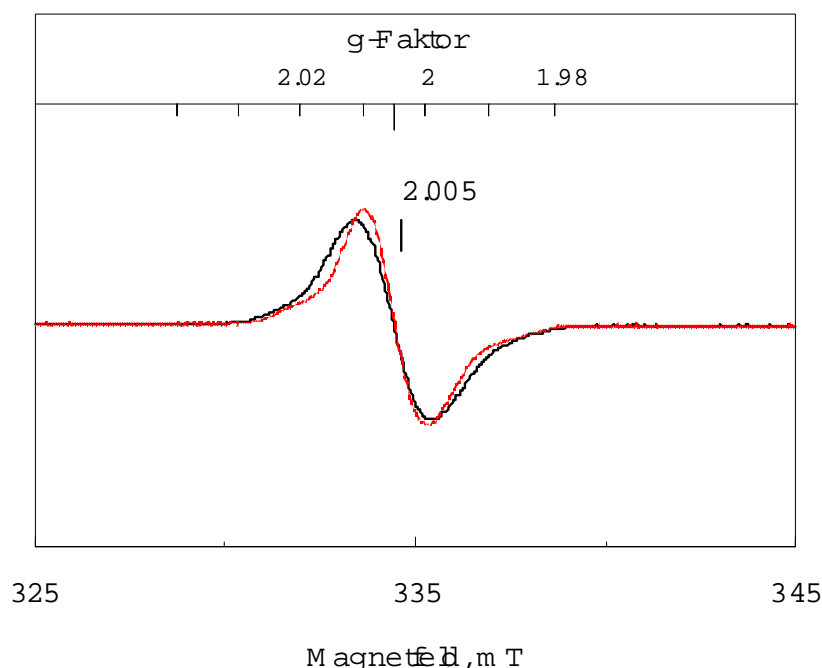


**Abbildung 10. UV-Vis Spektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in den drei möglichen Redoxzuständen des FAD.** Oxidiert, FAD-Benzochinon (durchgezogene Linie); Teilreduziert, FAD-Semichinon (gestrichelte Linie); Vollreduziert, FAD-Hydrochinon (gepunktete Linie). Die Spektren wurden mit 19,2  $\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in einer 1 ml-Küvette, Schichtdicke 1 cm oxidiert (durchgezogene Linie), teilreduziert mit 46,2  $\mu\text{M}$  Natriumdithionit (gestrichelte Linie) und vollreduziert mit 162,5  $\mu\text{M}$  Natriumdithionit (gepunktete Linie) aufgenommen. Die Absorptionsänderung bei 385 nm ist auf den Lampenwechsel des Photometers zurückzuführen.

Die Reduktion der Dehydratase mit Natriumdithionit zur FAD-Semichinon-Stufe führt zur Bildung der charakteristischen Absorptionsbande zwischen 500 nm – 620 nm und gleichzeitig zu einer Absorptionsabnahme zwischen 300 nm – 500 nm, wie sie für viele Flavin Semichinone beschrieben wird. Die Absorptionsmaxima liegen bei 350 nm und 442 nm. Die völlige Reduktion des FAD-Kofaktors der Dehydratase in die Hydrochinon-Stufe führt zu einem hellbraun gefärbtem Enzym. Die Reduktion vom Semichinon zum

Hydrochinon geht mit der Absorptionsabnahme der zuvor entstandenen breiten Absorptionsbande um 550 nm als auch mit dem Verlust der Absorption zwischen 300 nm – 500 nm einher. Das UV-Vis Spektrum zeigt nunmehr nur noch die Absorption der  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren, welche eine relativ unspezifische breite Absorption mit einer Schulter bei 400 nm aufweisen.

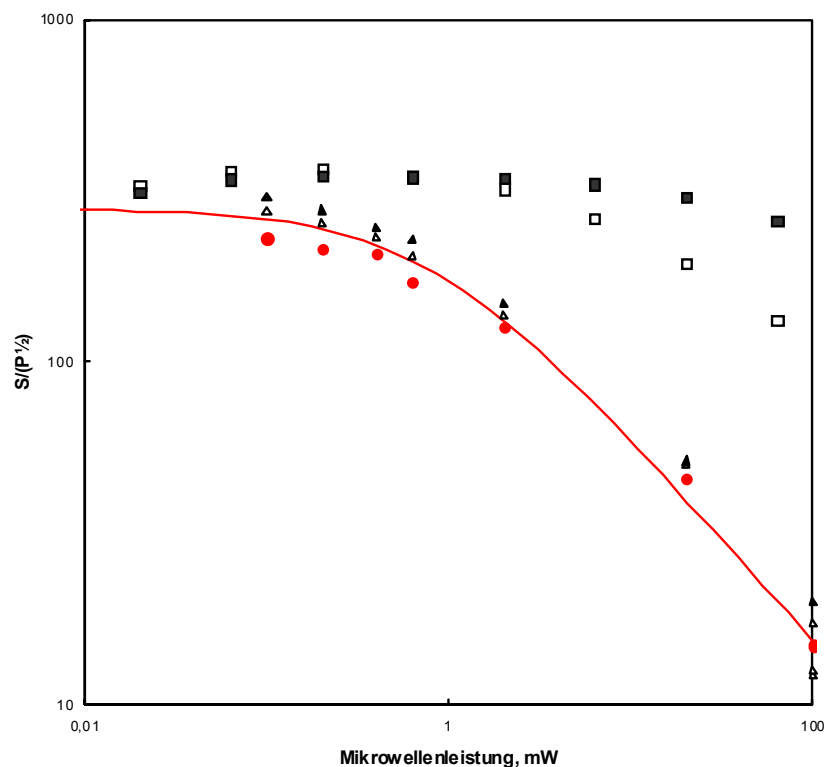
Das durch Natriumdithionit erzeugte FAD-Semichinon kann besonders gut mittels EPR-Spektroskopie detektiert und charakterisiert werden. Das FAD-Semichinon der Dehydratase zeigt ein isotropes EPR-Signal, welches ideal bei Temperaturen von  $>77$  K detektierbar ist und eine Linienbreite von 2,0 mT aufweist (Abbildung 11). Die Linienbreite von ca. 2,0 mT ist charakteristisch für neutrale Semichinone; wohingegen anionische Semichinone zumeist Linienbreiten von ca. 1,5 mT aufweisen<sup>126</sup>. Das Proton am Stickstoff  $N^5$  des Flavinrings der neutralen Semichinone führt zu einer Linienverbreiterung des isotropen EPR-Signals durch Hyperfine-Kopplungen. Durch einen Pufferaustausch mit einem  $\text{D}_2\text{O}$ -Puffer konnte das mit dem Lösungsmittel austauschbare Wasserstoffatom ersetzt werden, welches letztendlich zu einer Verringerung der Linienbreite auf 1,65 mT führte.



**Abbildung 11: EPR Spektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in  $\text{H}_2\text{O}$  (durchgezogene Linie) und  $\text{D}_2\text{O}$  (gestrichelte Linie).** Die Proben representieren die Semichinon Stufe des FAD nach Reduktion mit Natriumdithionit. Die Spektren wurden bei 160 K mit einer Mikrowellenleistung von 2 mW, einer Frequenz von 9,35 GHz und einer Modulations-Amplitude von 0,5 mT aufgenommen.

Im Weiteren wurde das Sättigungsverhalten des FAD-Semichinons Radikals der Dehydratase untersucht. Die Daten wurden mit zwei „einfachen“ Flavoproteinen

verglichen, die keine weiteren Kofaktoren besitzen. Zum Vergleich wurde das neutrale FMN-Semichinon von Flavodoxin aus *Anabaena* sp. PCC 7119<sup>127</sup> und das anionische FAD-Semichinon der Cholesterol-Oxidase aus *Brevibacterium sterolicum*<sup>128</sup> genommen. In Abbildung 12 sind repräsentative Mikrowellen-Sättigungskurven bei verschiedenen Temperaturen der Semichinone aus der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase und des Flavodoxins sowie exemplarisch ein „Fit“ für die Flavodoxin Werte gezeigt. Dieses „Fitting“ erlaubt die Bestimmung des  $P_{1/2}$ -Wertes, die jene Mikrowellenleistung beschreibt, bei der 50% des EPR-Signals gesättigt vorliegt.



**Abbildung 12: Representative Mikrowellen-Sättigungs-Kurven der neutralen Flavin Semichinone.** 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (■, □) und Flavodoxin aus *Anabaena* sp. PCC 7119 (▲, △); bei 80 K (offene Symbole), 150 K (geschlossene Symbole) und 250 K für Flavodoxin (●). Die EPR-Spektrometer Einstellungen entsprechen denen in Abbildung 12. Die Kurven wurden mit folgender Formel simuliert<sup>120</sup>:

$$\text{Signal Amplitude } S = S_0 \times \sqrt{P/(1 + P/P_{1/2})}^{b/2}$$

$S_0$  ist die ungesättigt vorliegenden Signalamplitude. Für den Inhomogenitätsfaktor  $b$  wurde ein Wert von 1,1 angenommen um einen optimalen Fit zu erreichen.

Das Sättigungsverhalten des Flavin Semichinons der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase zeigt signifikante Unterschiede zu den Semichinonen der sogenannten „einfachen“ Flavoproteine Flavodoxin und Cholesterol-Oxidase (Tabelle 6).

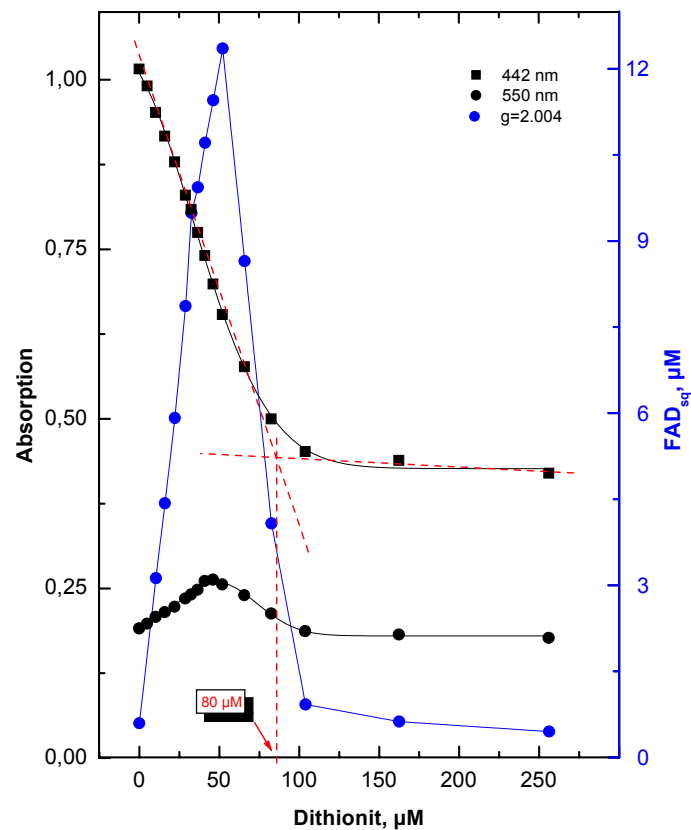
**Tabelle 6: Relaxationsverhalten des neutralen FAD-Semichinons der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase. Vergleich zum neutralen Semichinon von Flavodoxin aus dem Cyanobakterium *Anabaena* sp. PCC 7119 und dem anionischen Semichinon der Cholesterol-Oxidase aus *Brevibacterium sterolicum*.** Die sogenannte „Power for half saturation ( $P_{1/2}$ )“ wurde mit der von Rupp<sup>120</sup> beschriebenen Formel durch Curve-fitting erhalten.

Protein	Temperatur (K)	$P_{1/2}$ (mW)
4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (FAD-Semichinon)	40	0,08
	80	9
	150	100
Flavodoxin (FMN Semichinon)	85	0,80
	150	0,80
	253	0,80
Cholesterol-Oxidase (FAD-Semichinon)	80	0,35
	130	0,40
	200	0,65
	253	0,70

Die letztgenannten Proteine zeigen ein nahezu Temperatur-unabhängiges Relaxationsverhalten zwischen 80 K – 250 K, wie aus den  $P_{1/2}$ -Werten zu erkennen ist (Tabelle 6). Die Relaxation des Flavin Semichinons der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase dagegen nimmt bei Temperaturen über 40 K stark zu. Das Flavodoxin Semichinon und das FAD-Semichinon der Cholesterol-Oxidase dagegen, weisen ein Temperatur-unabhängiges Relaxationsverhalten auf. Das Relaxationsverhalten des FAD-Semichinons der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ist sehr ungewöhnlich für ein Flavoenzym. Diese Beobachtung kann durch eine magnetische Interaktion der Eisen-Schwefel-Zentren mit dem FAD-Semichinon erklärt werden, vorausgesetzt beide Kofaktoren befinden sich in enger Nachbarschaft (<10-15 Å) zueinander. Das Flavodoxins und die Cholesterol-Oxidase dagegen sind Flavoproteine ohne weitere Kofaktoren, die das Relaxationsverhalten des Semichinons beeinflussen könnten.

Zur Bestimmung der Elektronenaufnahmekapazität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurde das Enzym bei pH 7,5 mit einer zuvor exakt geeichten Natriumdithionit-Lösung titriert und parallel mit UV-Vis- und EPR-Spektroskopie die Bildung des FAD-Semichinons und FAD-Hydrochinons verfolgt (Abbildung 10+13).



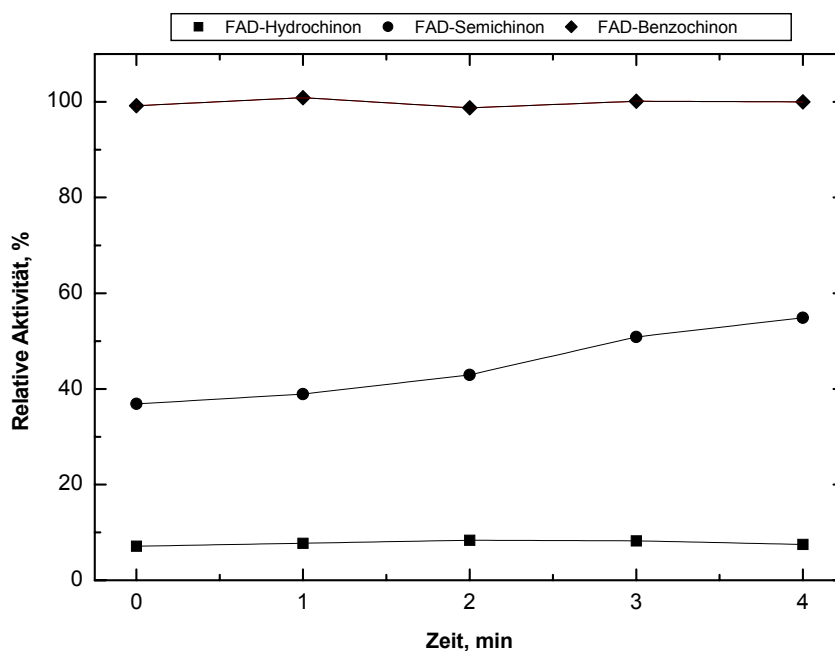


**Abbildung 13: Natriumdithionit-Titration der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase.** 19,2  $\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ( $\alpha_4$ ) wurde sukzessive mit einer geeigneten Natriumdithionit-Lösung reduziert. Es wurde nach jeder Natriumdithionitzugabe eine Probe zur Bestimmung der Absorption bei 442 nm und 550 nm als auch für die Quantifizierung des  $g = 2,001$  EPR-Signals entnommen. Die Reduktionsdauer betrug jeweils ca. 5 Minuten. Die Präparation hatte eine Dehydratase-Aktivität von 12,5 U/mg.

Um die maximale Ausbeute an FAD-Hydrochinon zu erhalten wurden für 77  $\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (Untereinheit) ca. 80  $\mu\text{M}$  Natriumdithionit benötigt. Da ein mol Natriumdithionit zwei mol Elektronen entspricht wurden pro Untereinheit der Dehydratase ca. 2 Elektronen aufgenommen. Die photometrische FAD-Bestimmung nach TCA-Fällung führte zu dem Ergebnis, dass ca. 3,3 FAD pro Homotetramer vorhanden sind. Dieser Befund entspricht den zuvor beschriebenen Untersuchungen, die das Vorhandensein von einem FAD pro Untereinheit der Dehydratase gezeigt haben. Die Quantifizierung des EPR-Signals ergab, dass maximal 12  $\mu\text{mol}$  FAD-Semichinon Radikal in dieser 77  $\mu\text{mol}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrataseprobe gebildet werden konnte. Bei der Annahme von 3,3 FAD pro Homotetramer wären demnach ca. 20% des gesamten FAD-Gehalts im Semichinon Zustand stabilisiert. In früheren Arbeiten wurde eine Semichinon-Stabilisierung von >90% angenommen. Jedoch stammt dieser Wert aus theoretischen Berechnungen, die auf der Basis der

Potentialdifferenz der zwei Halbpotentiale des FAD-Redoxsystems durchgeführt wurden<sup>97</sup> (siehe auch Material und Methoden 3.6.1.2). Dieser Unterschied kann dadurch erklärt werden, dass die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrataseprobe partiell inaktiviert war. Mit 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrataseproben, die 90 Minuten Luftsauerstoff ausgesetzt wurden und vollkommen inaktiv waren, war es nicht möglich, die FAD-Semichinonstufe zu generieren (nicht gezeigt). Es ist daher anzunehmen, dass die Inaktivierung mit Luftsauerstoff auch den FAD-Kofaktor beeinflusst und dies letztendlich zum Verlust der Semichinon-Stabilisierungseigenschaften führt.

Des Weiteren wurde die Aktivität der Dehydrataseprobe mit maximalem Anteil an FAD-Semichinon untersucht. Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nur im oxidierten Zustand die maximale Aktivität zeigt, wohingegen die Reduktion zum FAD-Hydrochinon zu einer reversiblen Inaktivierung führt<sup>11</sup>. Die Aktivität der Dehydratase auf der maximal möglichen FAD-Semichinonstufe beträgt ca. 40% im Vergleich zur FAD-Benzochinonstufe (Abbildung 14).

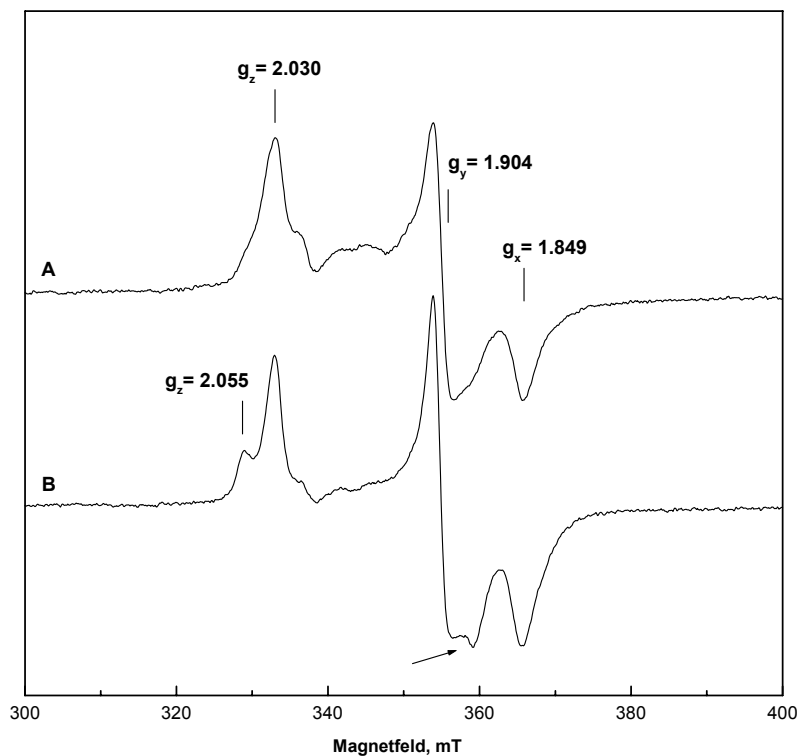


**Abbildung 14: Aktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in den drei Redoxzuständen des FAD Kofaktors.** Die Dehydratase-Aktivität wurde in den drei Redoxzuständen,  $\text{FAD}_{\text{ox}}$  (◆),  $\text{FAD}_{\text{sq}}$  (●) und  $\text{FAD}_{\text{hq}}$  (■) der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit dem in Material und Methoden 3.3.2.1 beschriebenen Enzymtest ermittelt.

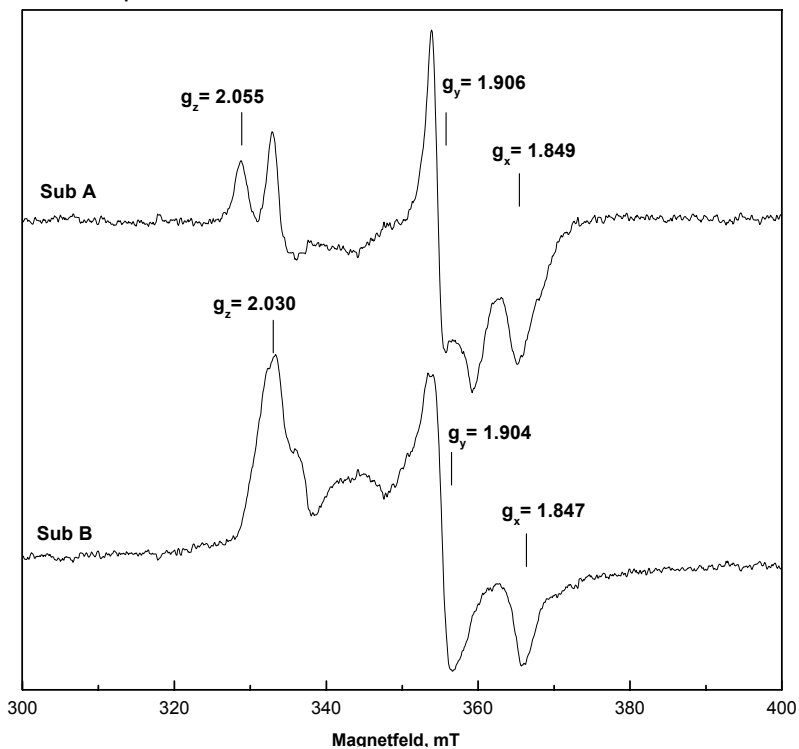
Im Weiteren wurde für diese Probe eine lineare Aktivitätssteigerung beobachtet, die nach 4 Minuten ca. 50% der maximal möglichen Aktivität einer oxidierten Probe aufwies. Die „Restaktivität“ von ca. 40 - 50% in der Semichinon-Präparation resultiert wahrscheinlich aus einer Disproportionierung des FAD zu Benzochinon und Hydrochinon und kann dadurch nicht dem Semichinon zugeschrieben werden. Demnach ist die zum FAD-Semichinon teilreduzierte 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase keine aktive Form des Enzyms.

#### 4.1.3 Charakterisierung der $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mittels EPR-Spektroskopie

Die Eisen-Schwefel-Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase konnten in früheren Mössbauer-spektroskopischen Untersuchungen eindeutig als  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren identifiziert werden<sup>98</sup>. Zudem war bekannt, dass die Reduktion der  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren zur EPR-aktiven  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Spezies nur durch langwierige (>45 Minuten) Photoreduktion in Gegenwart von 5-Deazaflavin möglich war. Die unvollständige Reduktion der Dehydratase führte zu geringen Ausbeuten von ca. 0,2 Spin pro Mol Enzym<sup>97</sup>. Photoreduktion der Dehydratase in Gegenwart von 5-Deazaflavin führte zur Detektion eines EPR-Spektrums, das charakteristisch für  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentren ist (Abbildung 15, Spektrum A). Dieses rhombische EPR-Signal wurde bei 4,2 K aufgenommen werden und ist mit einem g-Wert über  $g = 2,0$  und zwei g-Werten unter  $g = 2,0$  typisch für reduzierte Kubane. Bei einer Temperatur von 10 K und einer Mikrowellenleistung von 0,8 mW konnte ein komplexeres EPR-Spektrum detektiert werden (Abbildung 15, B). Es ist eine Aufspaltung der  $g_z$ -Werte in  $g = 2,055$  und  $g = 2,03$ , sowie eine nicht aufgelöste Verbreiterung des  $g_{yx}$ -Wertes zu erkennen. Das Spektrum deutet auf die Existenz von zwei rhombischen EPR-Signalen hin, die sich geringfügig in ihren g-Werten unterscheiden. Im Weiteren wurde versucht, die Spektren voneinander zu subtrahieren, um annäherungsweise die Einzelspektren der zwei EPR-Spezies zu erhalten. Die Einzelspektren konnten nur zum Teil als isolierte rhombische EPR-Signale dargestellt werden (Abbildung 16). Die Clusterspezies, die bei einer Temperatur von 4,2 Kelvin noch detektiert werden kann (Abbildung 16, A), hat demnach ein rhombisches EPR-Signal mit  $g_z = 2,030$ ,  $g_y = 1,904$  und  $g_x = 1,847$ . Die bei 4,2 K gesättigt vorliegende Radikalspezies zeigt ein rhombisches EPR-Signal mit  $g_z = 2,055$ ,  $g_y = 1,906$  und  $g_x = 1,849$ . Demnach sind hier zwei verschiedene Radikalspezies vorhanden, die sich deutlich im  $g_z$ -Wert unterscheiden.



**Abbildung 15: 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nach Photoreduktion in Gegenwart von 5-Deazaflavin.** 150  $\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase plus 100  $\mu\text{M}$  5-Deazaflavin für 30 Minuten bei 250 Watt reduziert. Beide Spektren wurden mit einer Mikrowellenleistung von 0,8 mW, einer Frequenz von 9,35 GHz und einer Mod.-Amplitude von 0,1 mT aufgenommen. Spektrum A bei 4.2 K, Spektrum B bei 10 K.



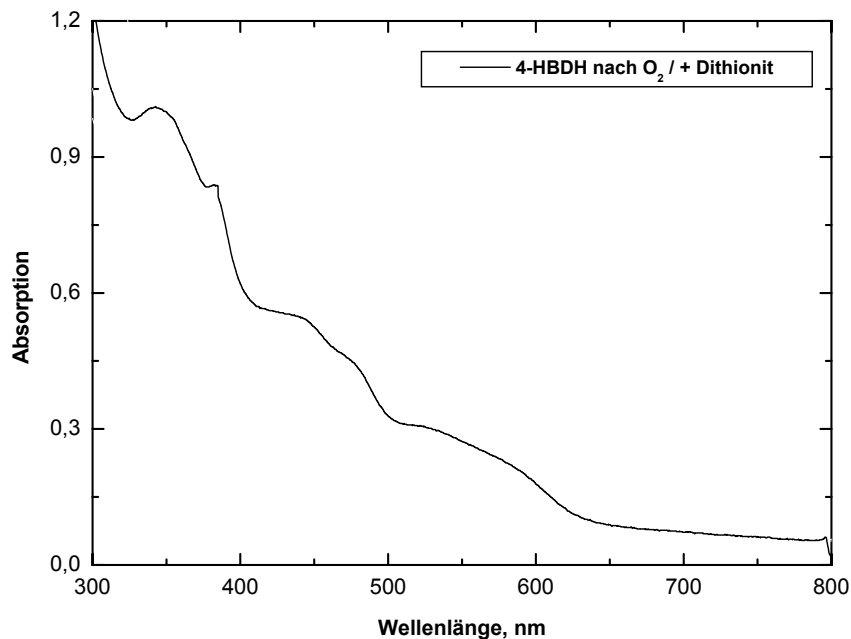
**Abbildung 16: Subtraktionspektren der photoreduzierten 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase.** „Sub A“ wurde durch Spektrum B-A und „Sub B“ wurde durch Spektrum A-B aus Abbildung 15 erhalten. Die Subtraktionsspektren sowie die ermittelten g-Werte wurden mit dem Program WinEPR® erstellt.

Beide EPR-Signale können als  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentren oder aber auch  $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$ -Zentren interpretiert werden. Zudem kann eine magnetische Kopplung zweier Eisen-Schwefel-Zentren nicht ausgeschlossen werden, obwohl keine typischen „Kopplungsmuster“, wie sie bei „8 Eisen-Ferredoxinen“ beobachtet werden, detektiert wurden<sup>22</sup>. Es könnte sich bei einem der Radikalsignale tatsächlich um ein reduziertes  $[2\text{Fe-2S}]$ -Zentrum handeln, das ein Inaktivierungsartefakt darstellt. Ein gutes Unterscheidungsmerkmal ist die Temperaturabhängigkeit bei der Aufnahme der EPR-Spektren. Da  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentren in der Regel nur bis zu Temperaturen  $< 40\text{ K}$  detektiert werden, wohingegen  $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$ -Zentren bis zu Temperaturen von  $< 70\text{ K}$  gut detektiert werden können, kann eine Differenzierung erfolgen<sup>22,129</sup>. Jedoch konnte keines von beiden EPR-Signalen bei Temperaturen bis zu  $70\text{ K}$  detektiert werden. Damit muss die Existenz von  $[2\text{Fe-2S}]$ -Zentren in dieser Dehydrataseprobe ausgeschlossen werden. In weiteren Untersuchungen mit Luftsauerstoff inaktivierten Dehydrataseproben wurden jedoch eindeutige Hinweise für die Bildung von  $[2\text{Fe-2S}]$ -Zentren gefunden, wie anhand verschiedener Methoden gezeigt werden konnte.

#### 4.1.4 Nachweis von $[2\text{Fe-2S}]$ -Zentren nach Inaktivierung mit Luftsauerstoff

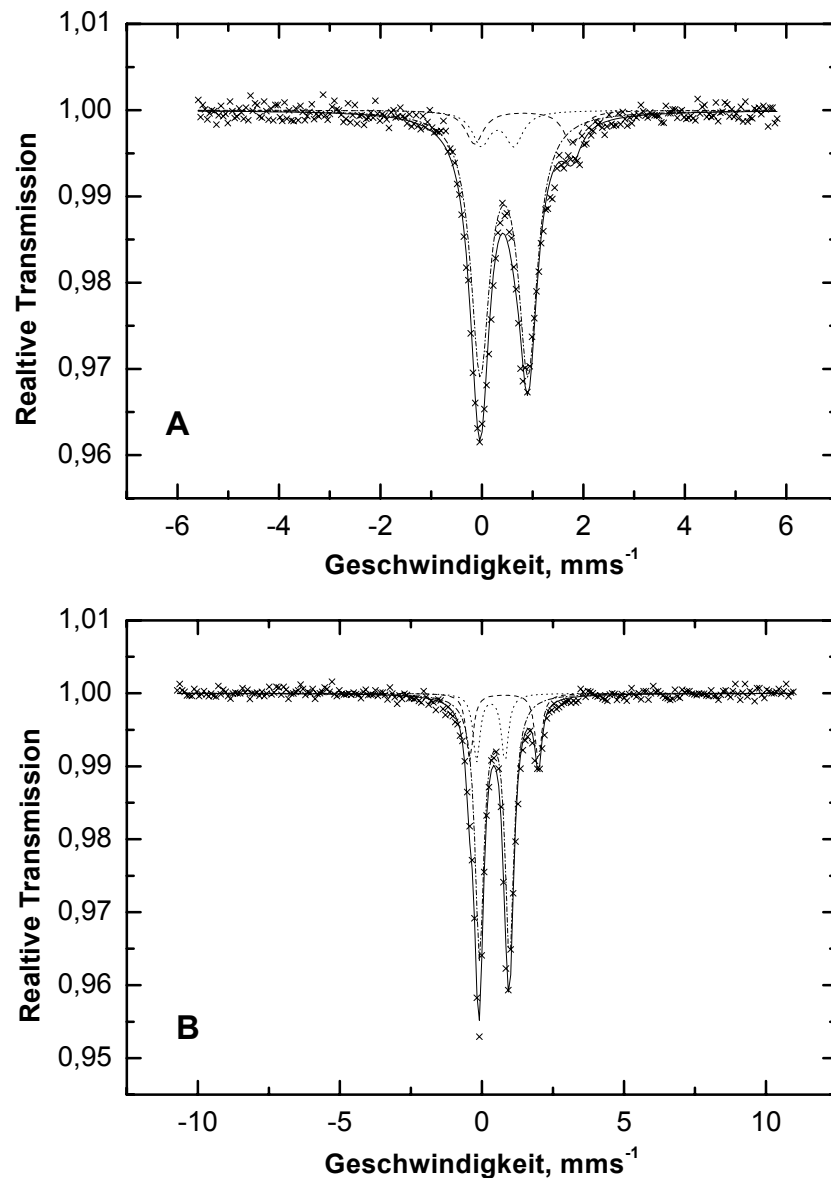
In früheren Untersuchungen wurde angenommen, dass die Sauerstoff-Inaktivierung der Dehydratase zum Zerfall der  $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentren führt<sup>97,98</sup>. Jedoch konnten keine eindeutigen Hinweise für die Bildung von  $[3\text{Fe-4S}]$ -Zentren oder  $[2\text{Fe-2S}]$ -Zentren gefunden werden. In dieser Arbeit wurden Dehydratase-Präparationen erhalten, die eine rötliche Farbe aufwiesen. Eisen-Schwefel Proteine können gut über ihre Farbe unterschieden werden. Während rot-braun gefärbte Proteine in der Regel  $[2\text{Fe-2S}]$ -Zentren aufweisen, sind Proteine mit  $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentren dunkel-braun gefärbt. Das UV-Vis Spektrum dieser „rötlich-schimmernden“ Dehydratase-Präparation unterscheidet sich signifikant von allen bisher gezeigten Absorptionsspektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (Abbildung 17). UV-Vis Spektren von  $[2\text{Fe-2S}]$ -Zentren sind in der Regel strukturiert und zeigen mehrere Absorptionsschultern, wohingegen  $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentren relativ uncharakteristische Absorptionsspektren aufweisen<sup>130</sup>. Dies gilt auch für diese teilweise inaktivierte Dehydrataseprobe. Es sind Absorptionsschultern bei  $343\text{ nm}$ ,  $442\text{ nm}$ ,  $470\text{ nm}$  und  $520\text{ nm}$  zu erkennen. Zwar sind andeutungsweise ähnliche Schultern auch für die Semichinon-Form der aktiven Dehydratase zum Teil sichtbar, jedoch unterscheiden sich die Proportionen der Maxima um  $340\text{ nm}$  und  $450\text{ nm}$ . Die Absorption der teilweise inaktivierten

Dehydratase bei 340 nm ist deutlich höher als bei der aktiven Dehydratase, wohingegen um 450 nm das Absorptionsverhalten genau umgekehrt ist. Zudem kann man bei dem inaktiven Enzym bei einer Wellenlänge von 500 nm – 600 nm die Ausbildung einer Absorptionsbande erkennen, die wiederum für die Existenz eines [2Fe-2S]-Zentrums spricht. Es muss angenommen werden, dass die Zerstörung der [4Fe-4S]-Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase über die Bildung von [2Fe-2S]-Zentren erfolgt.



**Abbildung 17. UV-Vis Spektrum einer zunächst teilweise inaktivierten und anschließend reduzierten 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase Probe.** Das Spektrum der teilweise inaktivierten „rötlich gefärbten“ 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase Präparation wurde mit einer ~30 µM Proteinkonzentration in einer 1 ml-Küvette mit Schichtdicke 1 cm aufgenommen. Die plötzliche Absorptionsänderung bei 385 nm ist auf den Lampenwechsel des Photometers zurückzuführen.

Der Nachweis von [2Fe-2S]-Zentren in der Dehydratase konnte mittels Mössbauer-Spektroskopie gezeigt werden. Aktive Dehydratase-Proben zeigen ein typisches Mössbauer-Spektrum für ein  $\text{Fe}^{+2,5}$  in tetraedrischer Schwefel-Koordination<sup>98</sup>. Dieser Zustand ist in einem [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum gegeben. Die Inaktivierung mit Luftsauerstoff und eine anschließende Reduktion mit Natriumdithionit führte zur Bildung eines neuen Mössbauer Signals, das einem [2Fe-2S]<sup>1+</sup>-Zentrum zugeordnet werden konnte (Abbildung 18). Dieses neue Subspektrum konnte mit ca. 10% des gesamten Eisens als  $\text{Fe}^{3+}$  und ca. 10%  $\text{Fe}^{2+}$  simuliert werden. Dieser Befund ist durch die Bildung von [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Zentren zu erklären, da diese Zentren eine absolute Delokalisation des Elektrons zwischen den beiden Fe-Atomen ermöglichen. Demnach sind in dieser Präparation ca. 10% [2Fe-2S]<sup>1+</sup>-Zentren entstanden, während 90% der Cluster in der nativen [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Form verblieben sind.

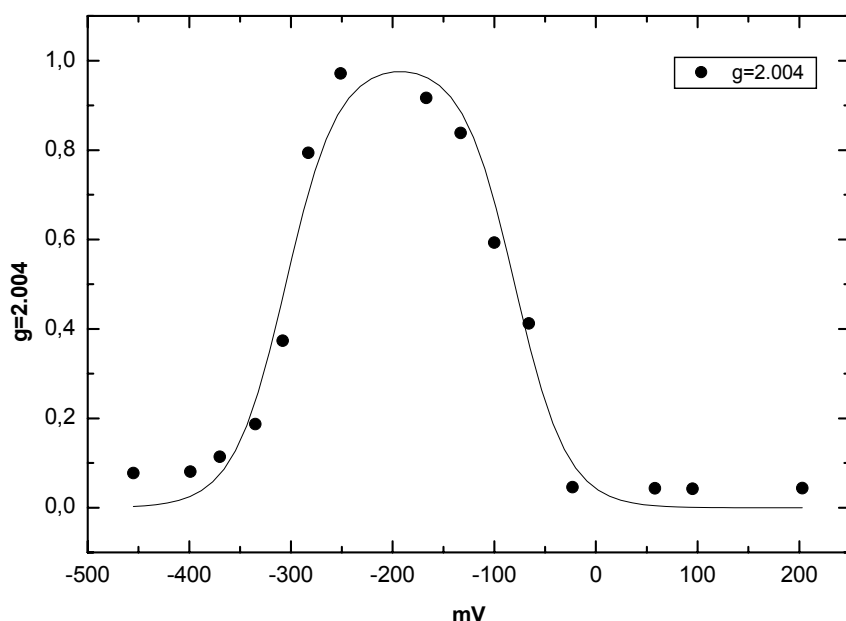


**Abbildung 18. Mössbauer-Spektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nach Natriumdithionit Reduktion bei pH 7,4.** Die Enzymkonzentration betrug 350  $\mu\text{M}$ . Die Probe wurde nur mit geringen Mengen ( $< 1 \text{ mM}$ ) an Natriumdithionit für ca. 5 min reduziert. Temperatur 80 K (Spektrum A, Kreuze) und 4,2 K (Spektrum B, Kreuze). Magnetfeld 0,2 mT. Spektrum A konnte mit drei Subspektren simuliert werden. Subspektrum 1 (gepunktete Linie):  $\delta = 0,31 \text{ mm/s}$ ;  $\Delta E_Q = 0,65 \text{ mm/s}$ ,  $\Gamma = 0,42 \text{ mm/s}$  (10% Signal); Subspektrum 2 (gestrichelte Linie):  $\delta = 0,82 \text{ mm/s}$ ;  $\Delta E_Q = 1,93 \text{ mm/s}$ ,  $\Gamma = 0,42 \text{ mm/s}$  (10% Signal); Subspektrum 3 (durchgezogene Linie):  $\delta = 0,44 \text{ mm/s}$ ;  $\Delta E_Q = 0,94 \text{ mm/s}$ ,  $\Gamma = 0,45 \text{ mm/s}$  (80% Signal). Das Subspektrum 3 entspricht einer Fe-Koordination wie sie in  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren vorkommt, wohingegen die Subspektren 1 und 2 Eisen Atomen in  $[\text{2Fe-2S}]^{1+}$ -Zentren zugeordnet werden können. Die Simulation des Mössbauerspektrums bei 4,2 K entspricht weitgehend den Daten die bei einer Temperatur von 80 K ermittelt wurden.

## 4.2 Charakterisierung der Redoxeigenschaften der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

### 4.2.1 Redoxtitration der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

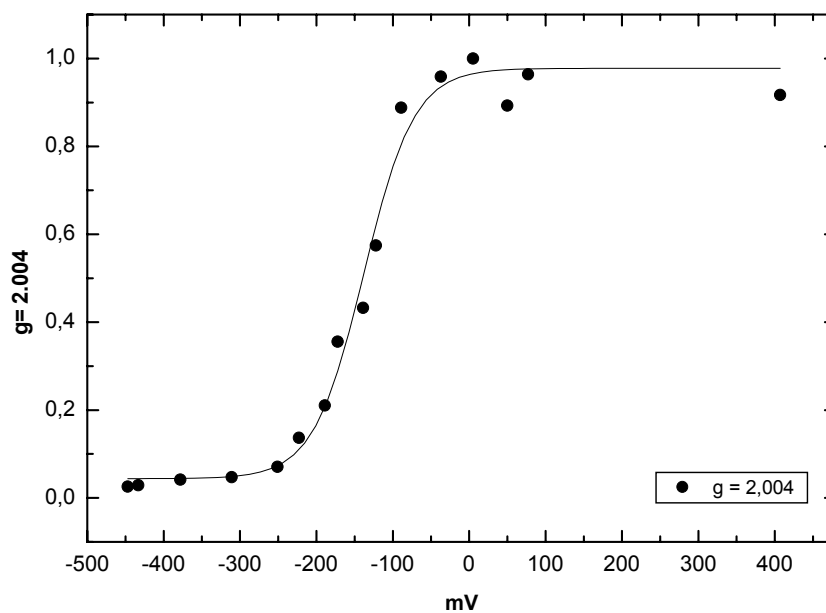
Zur Ermittlung der Redoxpotentiale für die prosthetischen Gruppen der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurden Redox titrationen in Gegenwart von Mediatoren durchgeführt und mittels EPR-Spektroskopie verfolgt. Die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase zeigte einen sehr ausgeprägten Hysterese-Effekt, d.h. die Redoxpotentiale variierten, je nachdem ob die Titration mit oxidiert vorliegender 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase oder reduziert vorliegender 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (FAD-Hydrochinon!) durchgeführt wurde. Die Redoxpotentiale für das FAD wurden über das EPR Signal bei  $g = 2,004$  ermittelt. Die ermittelten Daten konnten mit der Nernst Funktion simuliert werden (Abbildung 19).



**Abbildung 19: EPR-Redoxtitration des FAD der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (Reduktive Richtung).** Es wurde eine 21,7  $\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase Probe unter anaeroben Bedingungen sukzessiv mit Natriumdithionit reduziert (Durchführung: siehe Material und Methoden 3.6.1.1). Die EPR-Signalintensitäten wurden auf 1 normiert.

Die reduktive Titration der oxidiert vorliegenden 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase führte zur Bestimmung des  $\text{FAD}_{\text{ox/sq}}$  bzw.  $\text{FAD}_{\text{sq/hq}}$ -Übergangs. Es wurden Redoxpotentiale von  $-93 \text{ mV} \pm 6 \text{ mV}$  bzw.  $-298 \text{ mV} \pm 6 \text{ mV}$  bestimmt. Die Rücktitration der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase, die zuvor mit Überschuss an Natriumdithionit für ca. 90 Minuten reduziert wurde, erlaubte nur die Detektion des  $\text{FAD}_{\text{hq/sq}}$ -Übergangs mit einem Redoxpotential von  $-144 \text{ mV} \pm 5 \text{ mV}$  (Abbildung 20).



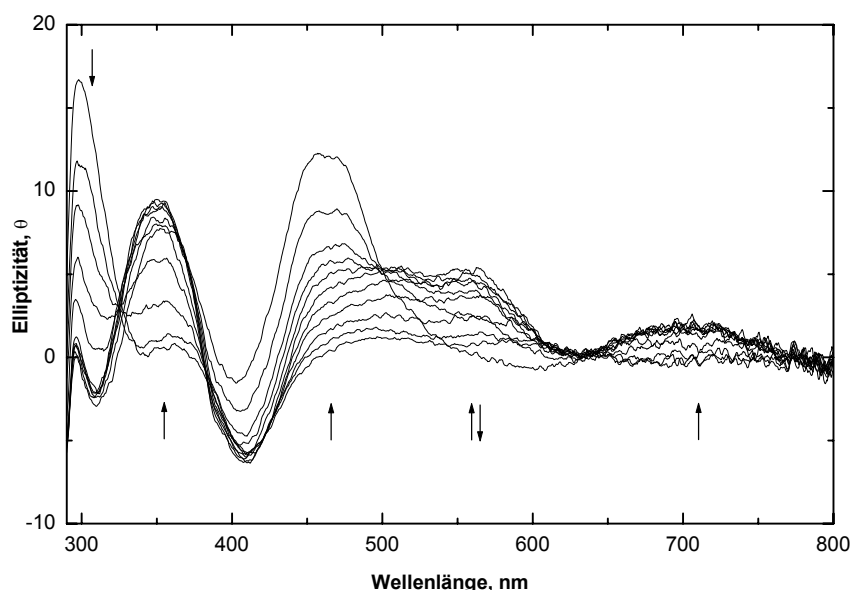


**Abbildung 20: EPR-Redox titration der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (Oxidative Richtung).** Es wurde eine 21,7  $\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrataseprobe mit Natriumdithionit für 90 Minuten reduziert und unter anaeroben Bedingungen sukzessiv mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxidiert.

Obwohl in einem Zeitrahmen von ca. 30 - 40 Minuten mit Überschuss an Kaliumhexacyanoferrat(III) oxidiert wurde, konnte die Bildung des FAD-Benzochinons nicht beobachtet werden. Dieser Effekt zeigt, dass die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase sich nicht wie ein klassisches Redoxenzym darstellt, welches in der Lage ist, innerhalb weniger Sekunden Elektronen Aufnahme- und Abgabefunktionen zu erfüllen. Aufgrund der hier erhalten Daten konnte die eindeutige Bestimmung der Redoxpotentiale für die FAD Redoxstufen der Dehydratase nicht erfolgen. Vielmehr verwundert die grosse Differenz der bestimmten Redoxpotentiale, die je nach Titrationsrichtung für den  $\text{FAD}_{\text{hq/sq}}$ -Übergang ca. 150 mV beträgt.

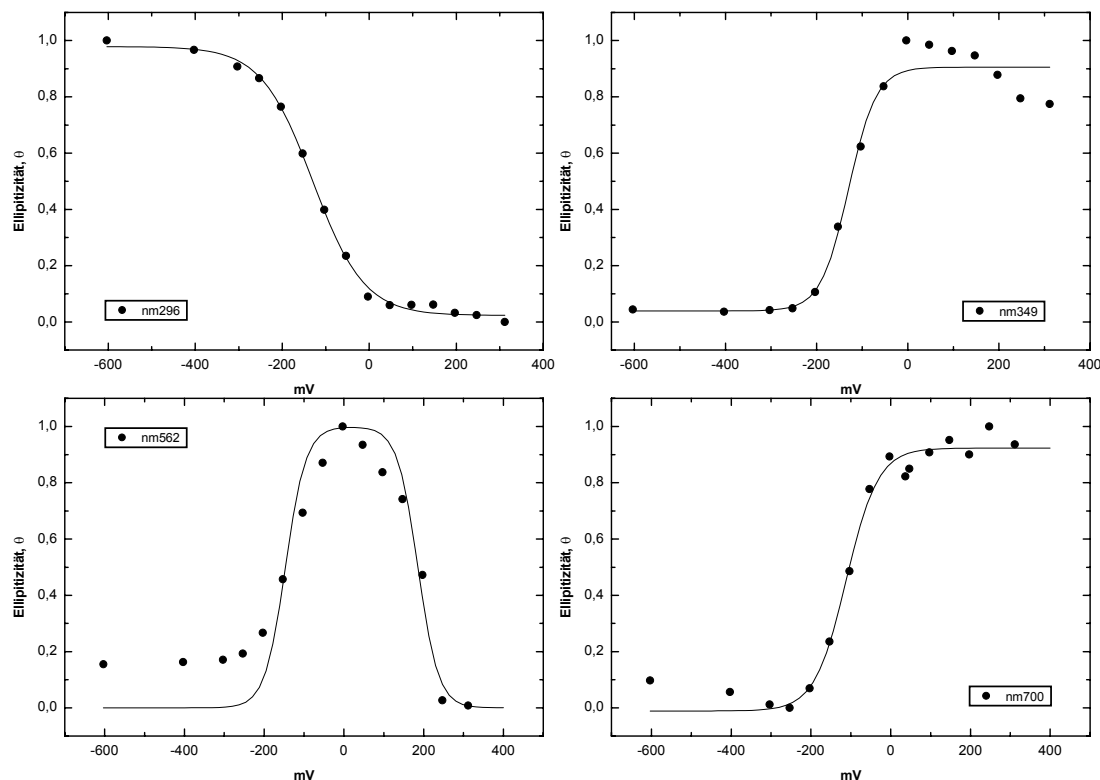
Diese Befunde konnten mit einer CD-spektroskopisch verfolgten elektrochemischen Redox titration in einer OTTLE-Zelle bestätigt werden. Die CD-Spektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase zeigen im oxidierten als auch reduzierten Zustand charakteristische Banden, die für Eisen-Schwefel Flavoproteine<sup>138,139</sup> beschrieben worden sind (Abbildung 21). Die elektrochemische Redox titration mittels der OTTLE-Zelle konnte über mehrere Wellenlängen verfolgt werden. Die Oxidation des Enzyms führte zu einer Abnahme der CD-Banden bei den Wellenlängen 349 nm, 457 nm und 700 nm, wohingegen die Bande bei 296 nm zunahm. Bei 562 nm wurde ein transients Anstieg der CD-Bande beobachtet, welche bei weitergehender Oxidation wieder auf das Grundniveau zurückfiel. Die Kofaktor

spezifischen Veränderungen im CD-Spektrum der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase entsprechen weitgehend denen des Absorptionsspektrums.



**Abbildung 21: CD-Spektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus einer Redox Titration in der OTTLE-Zelle (Oxidative Richtung).** Die Schichtdicke der Zelle betrug 0,01cm. Gezeigt sind die CD-Spektren bei -600 mV, -200 mV, -100 mV, -50 mV, 0 mV, +50 mV, +100 mV, +150 mV, +200 mV und +250 mV gegen SHE. Die Titration erfolgte ausgehend von einer reduzierten Probe (-600 mV) in oxidativer Richtung (die Pfeile zeigen die Intensitätsaufnahme- bzw. Abnahme).

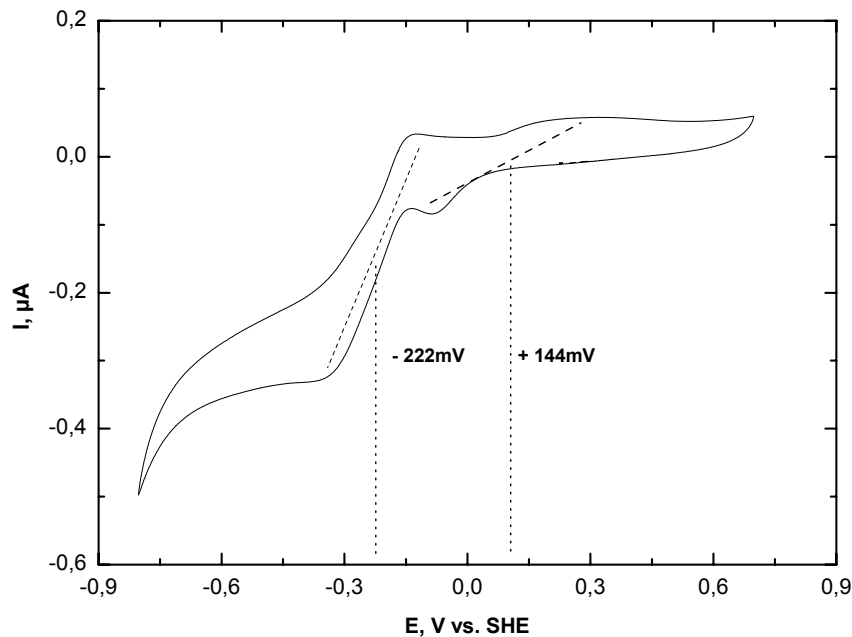
Die Änderungen im CD-Spektrum wurden mit der Nernst Funktion gefittet und die Redoxpotentiale der jeweiligen Spezies errechnet (Abbildung 22). Bei einer Wellenlänge von 296 nm konnte ein Redoxpotential von  $-127\text{ mV} \pm 5\text{ mV}$  erfasst werden. Mit  $-137\text{ mV} \pm 8\text{ mV}$  bei 349 nm,  $-110\text{ mV} \pm 6\text{ mV}$  bei 700 nm und  $-138\text{ mV} \pm 10\text{ mV}$  bei 562 nm wurden sehr ähnliche Redoxpotentiale detektiert. Ein sehr inhomogener Übergang bei 457 nm weist ein Redoxpotential von  $-97\text{ mV}$  auf. Sehr wahrscheinlich handelt es bei alle diesen Wellenlängen um die selbe Spezies. Im weiteren konnte bei 457 nm ein Redoxpotential von  $+171\text{ mV}$  und bei 562 nm ein Potential von  $+179\text{ mV} \pm 10\text{ mV}$  bestimmt werden. Auch hierbei handelt es sich bei beiden Wellenlängen wahrscheinlich um die gleiche Spezies. Aufgrund der zuvor erhalten Daten aus den EPR-Redox titrationen, können hier die beiden Flavin-Übergänge,  $\text{FAD}_{\text{hq/sq}}$  mit ca.  $-140\text{ mV}$  und  $\text{FAD}_{\text{sq/ox}}$  mit ca.  $+170\text{ mV}$  abgeleitet werden. Beide Übergänge sind um ca.  $+100\text{ mV}$  bis  $+150\text{ mV}$  ins Positive verschoben. Dieser Befund entspricht den vorherigen Beobachtungen aus den EPR-Redox titrationen. Für die  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren wurden keine Hinweise auf Veränderungen des Redoxzustands beobachtet und damit konnte in diesen Versuchen kein Redoxpotential bestimmt werden.



**Abbildung 22: CD-Redox titration der 4-Hydroxybutyryl-CoA (Oxidative Richtung).** Es wurde eine ca. 200  $\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase Probe unter anaeroben Bedingungen sukzessiv elektrochemisch an der Elektrode oxidiert und jeweils nach 15 Minuten Equilibrierungszeit das CD-Spektrum aufgenommen. Die Elliptizität bei verschiedenen Wellenlängen ist gegen das eingestellte Potential aufgetragen und mit der Nernst Funktion gefittet worden.

#### 4.2.2 Cyclovoltammetrie der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

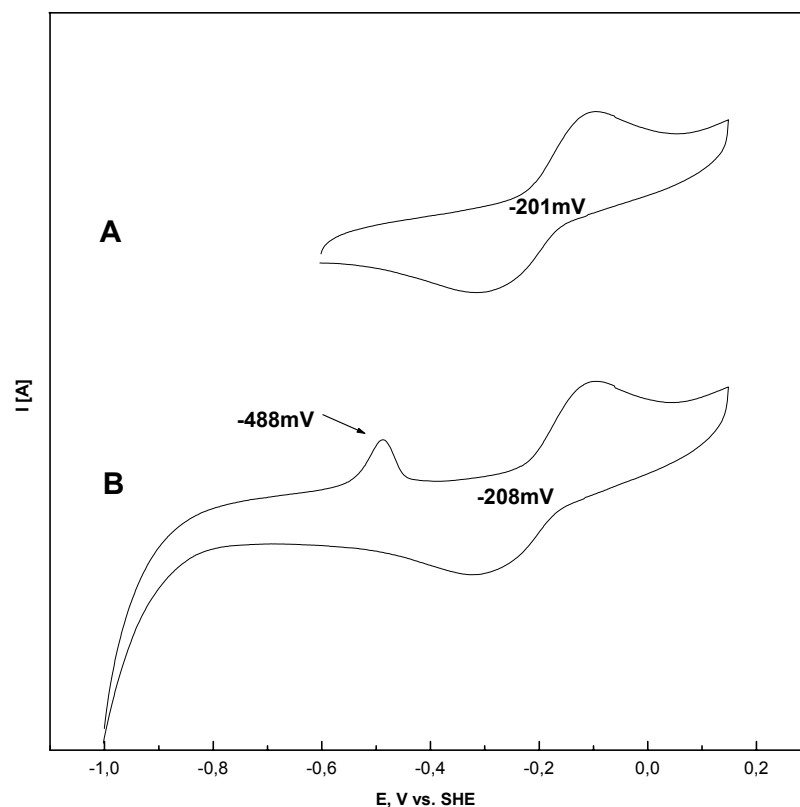
Die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurde mittels cyclischer Voltammetrie auf ihre Redox Eigenschaften an einer Glaskohlenstoffelektrode in Gegenwart von Polymyxin untersucht. Es hat sich gezeigt, dass die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mittels Cyclovoltammetrie charakterisiert werden kann, obwohl es sich um ein relativ großes Protein handelt (216 kDa). In der Regel ist diese Technik meistens nur für kleine Redoxproteine wie Ferredoxine oder Flavodoxine geeignet. Die Verwendung der Glaskohlenstoffelektrode führte zu wesentlich besseren Daten als die Verwendung der Pyrolytgraphit- oder Goldelektrode. Cyclovoltamogramme der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase erlaubten die Identifizierung der beiden Flavinübergänge  $\text{FAD}_{\text{sq/hq}}$  und  $\text{FAD}_{\text{sq/ox}}$  anhand der zuvor in Redox titrationen beobachteten ähnlichen Potentiale (Abbildung 23). Unter diesen Bedingungen konnte keine Reduktion der  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren beobachtet werden.



**Abbildung 23: Cyclovoltammogramm der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit den Elektronenübergängen für  $\text{FAD}_{\text{hq/sq}}$  und  $\text{FAD}_{\text{sq/ox}}$ .**  $\text{HNO}_3$  behandelte Gaskohlenstoffelektrode mit 355  $\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Anwesenheit von 200  $\mu\text{g/ml}$  Polymyxin. Potentialvorschubgeschwindigkeit 0,01 V/s.

Der  $\text{FAD}_{\text{sq/ox}}$ -Übergang wurde nur sehr inhomogen bei einem Potential von +144 mV detektiert. Im Vergleich dazu konnte bei der zuvor gezeigten CD-Redox Titration dieser Übergang bei +170 mV detektiert werden, wenn das Enzym zuvor reduziert wurde. Auch die EPR-Redox Titration hat gezeigt, dass dieser Übergang zu positiveren Potentialen verschoben ist, wenn das Enzym zuvor reduziert wurde, wohingegen die reduktive EPR-Redox Titration einer ausreichend lang oxidierten Enzymprobe diesen Übergang bei einem Potential von -93 mV zeigte. Der  $\text{FAD}_{\text{sq/hq}}$ -Übergang konnte in der Cyclovoltammetrie sehr gut bei einem Potential von -222 mV beobachtet werden. Auch hierbei können im Vergleich mit den statischen Redox Titrationen Ähnlichkeiten beobachtet werden. Während die reduktive Redox Titration einer oxidiert vorliegenden Enzymprobe zur Bestimmung eines Redoxpotentials von -298 mV führte, wurde in oxidativen Redox Titrationen für den selben Übergang ein Redoxpotential von -144 mV (EPR) bzw. -137 mV (CD) bestimmt. Demnach verhält sich die Dehydratase, je nachdem ob sie reduziert oder oxidiert vorliegt, unterschiedlich in ihren Redoxeigenschaften des FAD. Dieser Befund könnte durch eine signifikante Konformationsänderung des Proteins erklärt werden, die auch die Redoxeigenschaften der Kofaktoren verändert. Aufgrund dieser Beobachtung ist es nicht möglich, die Redoxpotentiale des FAD eindeutig zu bestimmen, da die Dehydratase sich nicht wie ein gewöhnliches Redoxenzym verhält.

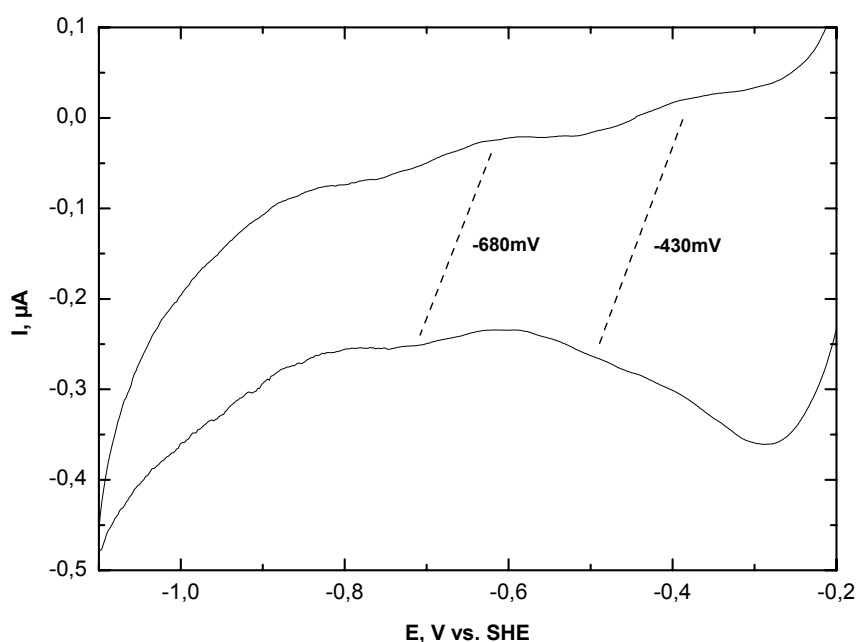
Weitere Versuche sollten klären, ob es möglich ist, die Eisen-Schwefel-Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mittels Cyclovoltammetrie zu charakterisieren. Obwohl die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in den zuvor gezeigten Versuchen mit einem extrem niedrigen Potential von  $-1\text{ V}$  reduziert wurde, konnten im CV keine weiteren Signale beobachtet werden. Die Reduktionsdauer, welche bekanntlich eine wichtige Rolle bei der Reduktion der Eisen-Schwefel-Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase spielt, kann in den zuvor gezeigten CV-Experimenten aus der Potentialvorschubgeschwindigkeit ermittelt werden. Da gewöhnlich  $0,1\text{ V/s}$  eingestellt wurden, betrug die Dauer für einen Reduktionszyklus ca. 12 Sekunden bei Potentialen von  $< -400\text{ mV}$ . Wenn die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase an der Elektrode für längere Zeit (Minuten) bei einem Potential von  $< -1\text{ V}$  reduziert wurde, konnte ein neues Signal auf dem „oxidativen Ast“ des Cyclovoltammogramms bei  $-488\text{ mV}$  beobachtet werden (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Cyclovoltammogramme der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit und ohne Vorreduktion.**  $355\text{ }\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Anwesenheit von  $200\text{ }\mu\text{g/ml}$  Polymyxin. Potentialvorschubgeschwindigkeit  $0,1\text{ V/s}$ . A) 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase gescannt von  $-600$  bis  $0\text{ mV}$ ; B) 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase gescannt von  $-1000$  bis  $0\text{ mV}$ .

Es handelt sich hierbei um eine sehr inerte Redoxspezies, die nur bei einem sehr niedrigen Reduktionspotential und sehr langer Reduktionsdauer beobachtet werden

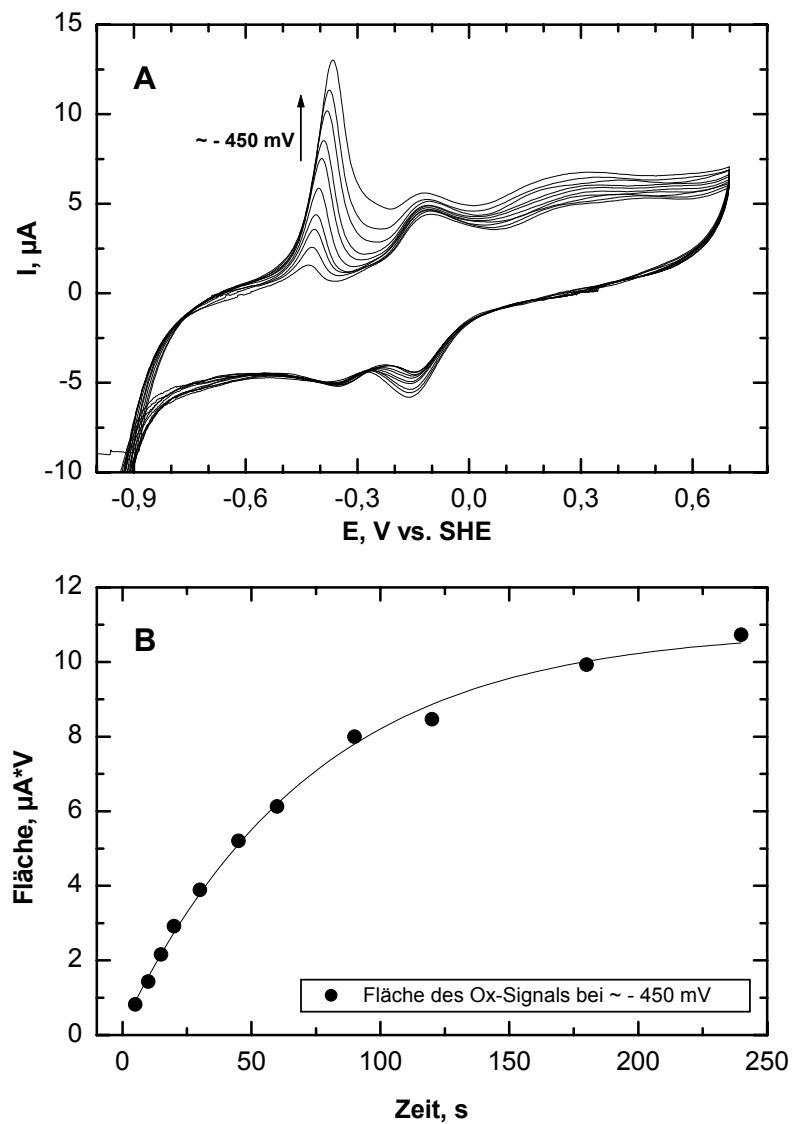
konnte. Aufgrund dieser sehr langsamen Reduktionskinetik konnte bei den verwendeten Potentialvorschubgeschwindigkeiten nicht das dazugehörige Reduktionssignal auf dem reduktiven Ast des Cyclovoltammogramms detektiert werden. Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei dieser Redoxspezies um das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Zentrum der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase. Im Weiteren konnte beobachtet werden, dass sich in solchen Dehydrataseproben, die mehrmals und für längere Zeit bei Potentialen  $< -500$  mV an der Elektrode reduziert wurden, zusätzliche Signale im niedrigen Potentialbereich ausgebildet haben (Abbildung 25). Es handelt sich hierbei immer um sehr schwache Signale, die jedoch reversibel sind. Es wurden zwei Redoxpaare mit Mittelpunktspotentialen von  $-680$  mV und  $-430$  mV bestimmt. Diese Elektronenübergänge können nur den Eisen-Schwefel-Zentren zugeordnet werden. Da aber außer den  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren keine weiteren redoxaktiven Kofaktoren in der Dehydratase bekannt sind, ist es verwunderlich, dass hier zwei Elektronenübergänge bei verschiedenen Potentialen detektiert werden konnten.



**Abbildung 25: Cyclovoltammogramm der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nach mehreren reduktiven Zyklen.** 326  $\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Anwesenheit von 200  $\mu\text{g/ml}$  Polymyxin. Potentialvorschubgeschwindigkeit 0,1 V/s. Das Cyclovoltammogramm wurde nach einer vorangegangenen Reihe von CV-Versuchen bei sehr niedrigen Potentialen ( $< -1$  V) aufgenommen. Es konnten danach zwei neue Redoxpaare bei  $-430$  mV und  $-680$  mV detektiert werden.

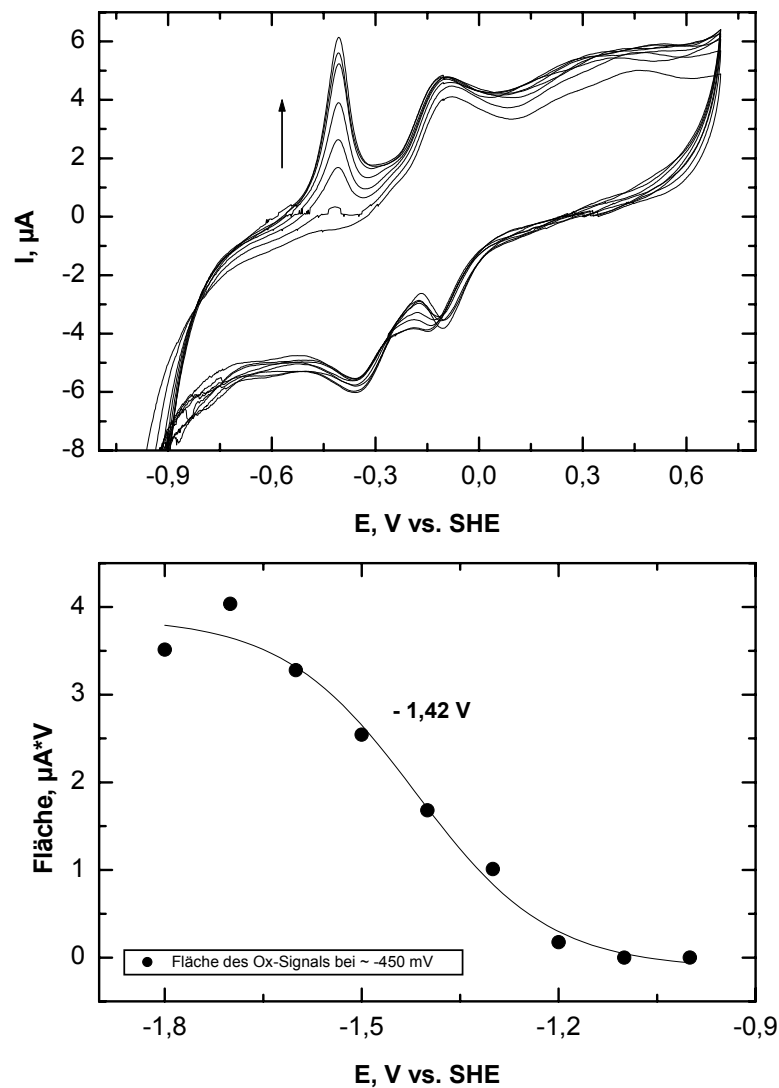
Die Reduktionskinetik als auch die Bestimmung des dafür notwendigen Reduktionspotentials zur Ermittlung des Redoxpotentials für das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Zentrum genau analysiert. Dafür wurde der zuvor beschriebene Oxidationspeak im Cyclovoltammogramm von extrem reduzierter Dehydratase zu Hilfe genommen. Die

Aufnahme der Reduktionskinetik erfolgte bei einem Potential von  $-1,45\text{ V}$  nachdem die Dehydratase jeweils für  $5 - 240$  Sekunden reduziert wurde. Anschließend wurde ein Cyclovoltammogramm aufgenommen und die Fläche des Oxidationspeaks ermittelt. Da die Fläche des Strompeaks proportional zu der transferierten Elektronenmenge ist, kann darüber die Reduktion des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren quantitativ erfasst werden. Es wurde mit  $-1,45\text{ V}$  ein sehr niedriges Potential gewählt, um möglichst unter dem tatsächlich erforderlichen Reduktionspotential zu liegen. Der Scan wurde mit einer Potentialvorschubgeschwindigkeit von  $0,01\text{ V/s}$  von  $-0,9\text{ V}$  bis  $0,6\text{ V}$  gefahren. Die Reduktionskinetik für das Oxidationssignal bei  $-432\text{ mV}$  ist in Abbildung 26 gezeigt. Die maximal mögliche Ausbeute an diesem Signal wird erst nach ca. 4 Minuten Reduktion bei  $-1,45\text{ V}$  erzielt. Die Halbwertszeit bei diesem Reduktionsexperiment betrug 47 Sekunden. Dieses Ergebnis zeigt, dass unter diesen Bedingungen ca. 4 Minuten Reduktionsdauer erforderlich sind, um die Eisen-Schwefel-Zentren der Dehydratase vollständig zu reduzieren. Diese Beobachtung konnte nun für die Bestimmung des Redoxpotentials für das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Zentrum der Dehydratase herangezogen werden. Dafür musste bei unterschiedlichen Potentialen die Dehydratase für jeweils 4 Minuten reduziert und anschließend das Cyclovoltammogramm aufgenommen. Um das Enzym zu schonen, wurde zunächst nur mit einer Reduktionsdauer von jeweils 2 Minuten gearbeitet und angenommen, dass mehr als 80% der gesamten Eisen-Schwefel-Zentren reduziert vorliegt. Das eingestellte Reduktionspotential der Vorinkubation wurde gegen die Peakfläche des „Oxidationssignals“ aufgetragen, und konnte anschliessend mit der Nernst Funktion simuliert werden. Für das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Zentrum wurde ein Redoxpotential von  $-1,42\text{ V}$  ermittelt (Abbildung 27). In späteren Versuchen hat sich gezeigt, dass die Reduktionsdauer von 2 Minuten nicht ausreichend war, um das tatsächliche Redoxpotential zu bestimmen. Dieses Ergebnis zeigt jedoch, dass über diesen experimentellen Ansatz ein genaueres Redoxpotential für den  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Übergang ermittelt werden kann.



**Abbildung 26: Reduktionskinetik der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase an der Elektrode.** Die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurde bei  $-1,45\text{ V}$  bei unterschiedlichen Zeiten reduziert und danach das Cyclovoltammogramm ermittelt.  $326\text{ }\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Anwesenheit von  $200\text{ }\mu\text{g/ml}$  Polymyxin. Potentialvorschubgeschwindigkeit  $0,1\text{ V/s}$ . In B) ist die Signalfäche des Oxidationssignals gegen die Reduktionsdauer aufgetragen.



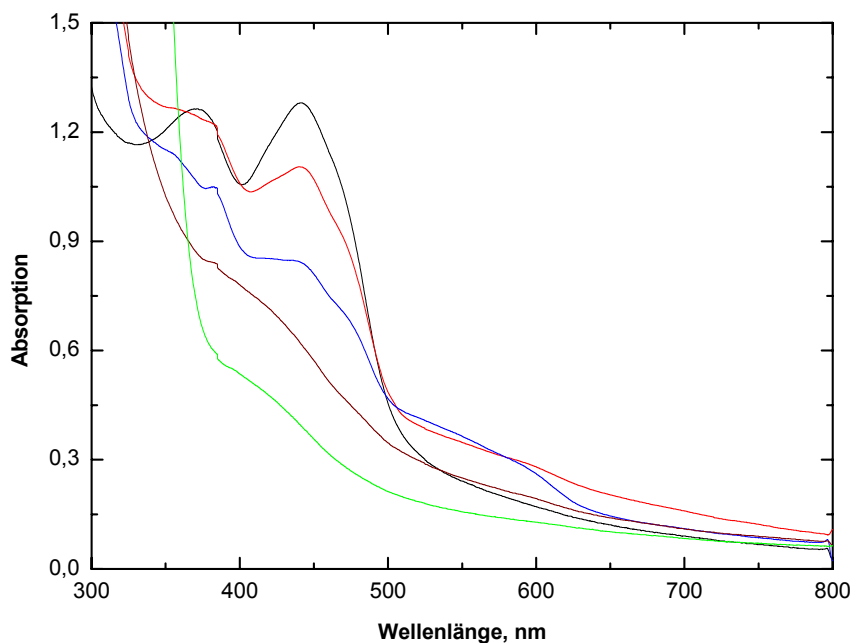


**Abbildung 27: Bestimmung des Redoxpotentials des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$  Zentrums der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase.** Die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurde bei unterschiedlichen Potentialen für jeweils 2 Minuten reduziert und danach das Cyclovoltammogramm ermittelt. Potentialvorschubgeschwindigkeit 0,1 V/s. In B) ist die Signalfäche des Oxidationssignals gegen das eingestellte Reduktionspotential aufgetragen.

### 4.3 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Substrat

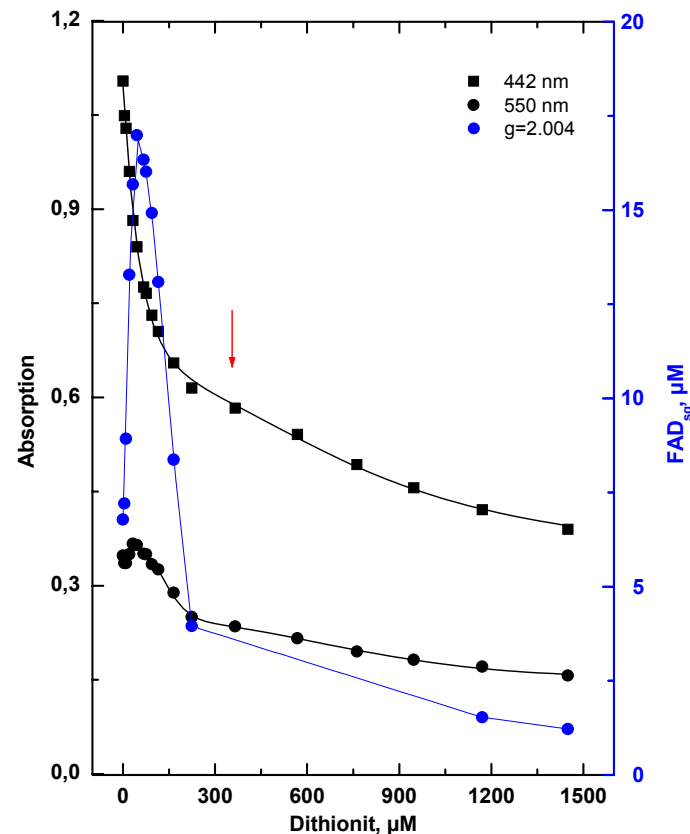
#### 4.3.1 Modulation der Redoxeigenschaften der Kofaktoren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase durch Substrat

Die Titration der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit Natriumdithionit in Anwesenheit von Substrat führte zu einer Veränderung der Redoxeigenschaften. Zunächst wurde nach Zugabe von Crotonyl-CoA zu oxidiert vorliegender 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase die Bildung eines FAD-Semichinons sowie einer Charge-Transfer-Bande beobachtet (Abbildung 28, rote Linie). Diese Beobachtung wird in den folgenden Kapiteln im Detail beschrieben und näher charakterisiert. Die zusätzliche Reduktion dieser Probe mit Natriumdithionit führte zur Reduktion der  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren, welche durch die deutliche Absorptionsabnahme über den gesamten Wellenlängenbereich um 400 nm detektiert werden konnte (Abbildung 28, grüne Linie und Abbildung 29).



**Abbildung 28: UV-Vis-Spektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Anwesenheit von Substrat und Natriumdithionit** Die Spektren in Gegenwart von 1,6 mM Crotonyl-CoA wurden mit 26 µM 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aufgenommen (alle farbigen Linien). Das Spektrum ohne Crotonyl-CoA (schwarze Linie) wurde mit 19,2 µM 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aufgenommen und mit einem Faktor von 1,26 multipliziert um die Proteinkonzentration anzugleichen. FAD-Semichinon- und Charge-Transfer-Bildung nach Zugabe von Crotonyl-CoA (rote Linie). Dehydrataseprobe nach Zugabe von 45 µM Natriumdithionit sowie maximale FAD-Semichinonbildung (blaue Linie). Dehydrataseprobe im FAD-Hydrochinon-Zustand nach Zugabe von 220 µM Natriumdithionit (braune Linie). Dehydrataseprobe nach Zugabe von 1,5 mM Natriumdithionit (grüne Linie) sowie Reduktion der  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren.

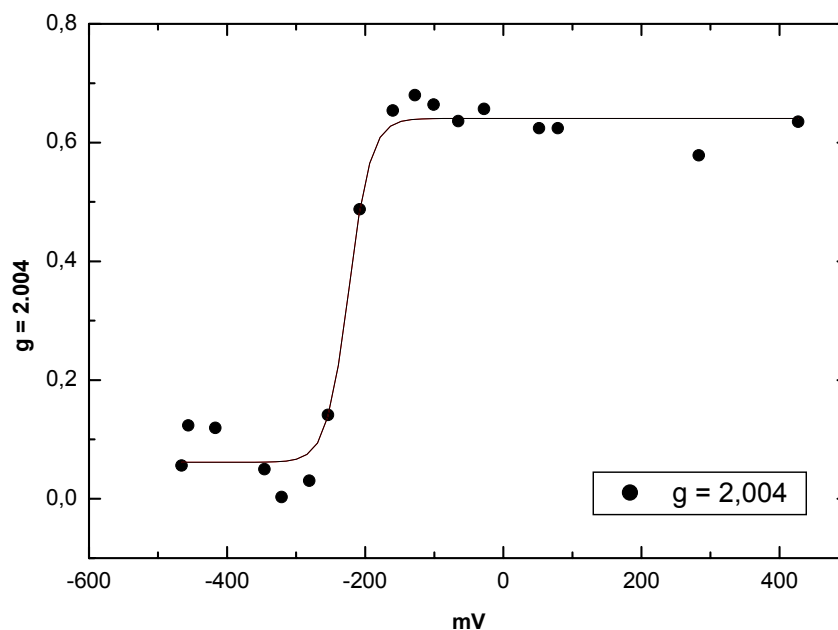
Die  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ohne Substrat sind unter diesen Bedingungen nicht bzw. nur sehr schwer reduzierbar wie zuvor beschrieben wurde. Demnach führt die Substratbindung zu einer Veränderung des Redoxpotentials zu positiveren Werten für die  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren.



**Abbildung 29: Natriumdithionit-Titration der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Anwesenheit von Substrat.** 26 µM 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Anwesenheit von 1,5 mM Crotonyl-CoA wurde sukzessive mit einer geeichten Natriumdithionit-Lösung reduziert. Es wurde nach jeder Natriumdithionitzugabe eine Probe zur Bestimmung der Absorption bei 442 nm und 550 nm als auch für die Quantifizierung des  $g = 2,001$  EPR-Signals entnommen. Die Reduktionsdauer betrug jeweils ca. 5 Minuten. Die Präparation hatte eine Aktivität von 9,5 U/mg. Der Pfeil verdeutlicht die weitere Absorptionsabnahme nachdem das FAD-Hydrochinon gebildet worden ist.

EPR-Redox titrationen der Dehydratase in Gegenwart von Crotonyl-CoA sollten klären, wie groß der Einfluss der Substratbindung auf die Redoxpotentiale der Kofaktoren ist. Dafür wurde oxidiert vorliegende 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase zunächst mit Crotonyl-CoA versetzt und die in Material und Methoden 3.6.1 beschriebene Redox titration durchgeführt. Die sukzessive Reduktion mit Natriumdithionit ermöglichte die Bestimmung des  $\text{FAD}_{\text{sq/hq}}$ -Übergangs bei einem Potential von  $-229 \text{ mV} \pm 7 \text{ mV}$  (Abbildung 30). Bei der vergleichbaren Redox titration ohne Crotonyl-CoA wurde dieser Übergang zuvor mit  $-298 \text{ mV}$  detektiert (Ergebnisse 4.5.1) Demnach erfolgt nach Substratbindung eine Erhöhung des  $\text{FAD}_{\text{sq/hq}}$ -

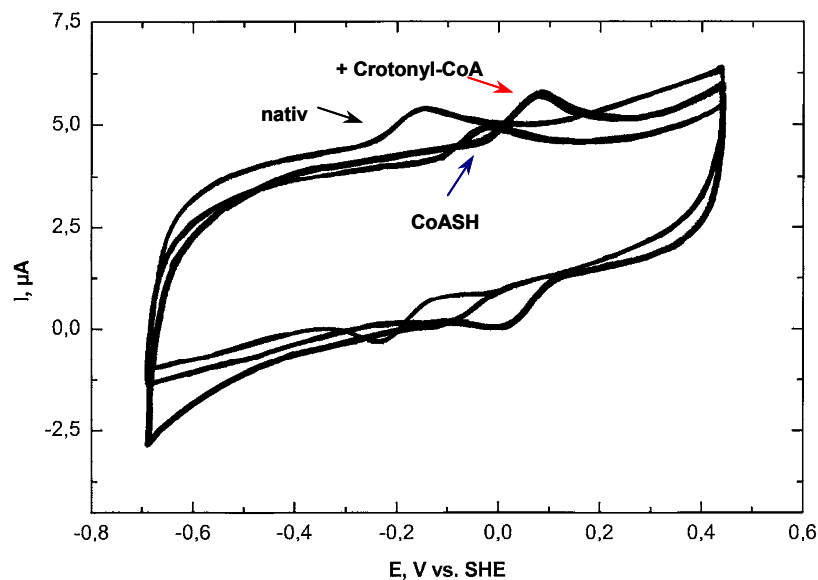
Redoxpotentials von ca. +70 mV. Es ist anzumerken, dass für diesen Übergang in der oxidativen Redoxtitration ohne Substrat ein Wert von -144 mV bestimmt wurde (Ergebnisse 4.2.1). Aufgrund der signifikanten Unterschiede die in den statischen Redox titrationen bei der Hin- und Rücktitration beobachtet wurden, dürfen nur gleichwertige Redox titrationen miteinander verglichen werden. Auch für den  $\text{FAD}_{\text{ox/sq-}}$  Übergang ist eine Verschiebung des Redoxpotentials in den positiven Bereich zu erwarten, jedoch konnte dieser Übergang bei dem hier gezeigten Experiment nicht ermittelt werden, da das verwendete Kaliumhexacyanoferrat(III) nicht in der Lage war das FAD-Semichinon zu oxidieren.



**Abbildung 30: EPR-Redox titration der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Crotonyl-CoA (Reduktive Richtung).** Es wurde eine oxidiert vorliegende 21,7  $\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrataseprobe mit 1 mM Crotonyl-CoA versetzt und unter anaeroben Bedingungen sukzessiv mit Natriumdithionit reduziert.

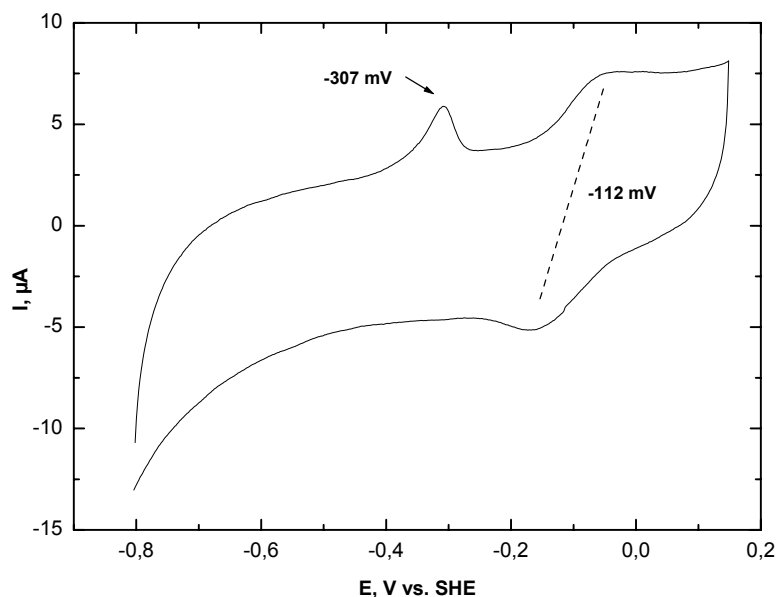
Zur detaillierten Charakterisierung der Redox Eigenschaften der Dehydratase wurden weitere Versuche mittels cyclischer Voltammetrie durchgeführt. Mittels dieses dynamischen Verfahrens sollte die Verschiebung der Redoxpotentiale der Kofaktoren der Dehydratase bestätigt werden. Die Zugabe von Crotonyl-CoA zur 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase führte zu einer Verschiebung des Redoxpotentials für den  $\text{FAD}_{\text{sq/hq-}}$  Übergang um +219 mV ins Positive (Abbildung 31). Interessanterweise führte auch die Zugabe von CoASH zu einer Verschiebung des Redoxpotentials. Bei Zugabe von CoASH wurde für den  $\text{FAD}_{\text{sq/hq-}}$  Übergang eine Erhöhung von +133 mV beobachtet. Demnach kann CoASH an die Dehydratase binden und auch die Redox Eigenschaften des Enzyms modulieren, obwohl es kein

Substrat der Dehydratase darstellt. Der  $\text{FAD}_{\text{sq/ox}}$ -Übergang wurde bei diesen Versuchsbedingungen nicht berücksichtigt, da sich gezeigt hat, dass die Aufnahme der Cyclovoltammogramme bei sehr positiven Potentialen zu einer Proteinpräzipitation an der Elektrode führte. Daher wurden die Cyclovoltammogramme möglichst nur für eine kurze Dauer bis maximal +400 mV gescannt.



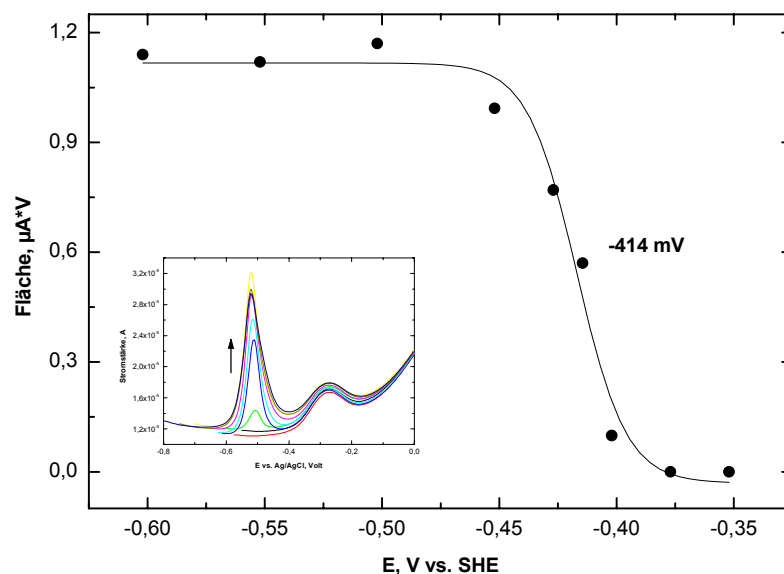
**Abbildung 31: Cyclovoltammogramme der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von CoASH und Crotonyl-CoA.** 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (schwarze Linie), + CoASH (blaue Linie) oder + Crotonyl-CoA (rote Linie).  $\text{HNO}_3$  behandelte Gaskohlenstoffelektrode mit  $220 \mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Anwesenheit von  $200 \mu\text{g/ml}$  Polymyxin. Die Crotonyl-CoA Konzentration beträgt  $1 \text{ mM}$ , die für CoASH  $10 \text{ mM}$ . Potentialvorschubgeschwindigkeit  $0,1 \text{ V/s}$ .

Cyclovoltammogramme der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Anwesenheit von Crotonyl-CoA, die nach einer Equilibrierung bei  $-800 \text{ mV}$  aufgenommen wurden, zeigen eine Verschiebung des zuvor bei  $-488 \text{ mV}$  beobachteten Strompeaks auf dem oxidativen Ast hin zu einem Potential von  $-307 \text{ mV}$  (Abbildung 32). Demnach erfolgt die Oxidation der  $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ -Zentren zu  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren in Gegenwart von Substrat bei einem Potential das ca.  $+150 \text{ mV}$  höher liegt als bei nicht Substrat-gebundener Dehydratase. Gleichzeitig wird auch in diesem Versuch der  $\text{FAD}_{\text{hq/sq}}$ -Übergang ins Positive verschoben, jedoch nur um  $+100 \text{ mV}$ . Dieser Wert ist deutlich niedriger als der ursprünglich beobachtete Wert von ca.  $+200 \text{ mV}$ . Diese Variation in der Intensität der Potentialveränderung könnte in der hier vorgenommen starken Vorreduktion mit  $-800 \text{ mV}$  begründet sein, da ohne Vorreduktion wiederum eine Potentialverschiebung um ca.  $+200 \text{ mV}$  bestimmt werden konnte.



**Abbildung 32: Cyclovoltammogramme der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit und ohne Substrat nach Reduktion.** A) ohne Substrat; B) mit Substrat. 326  $\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Anwesenheit von 200  $\mu\text{g/ml}$  Polymyxin. Die Crotonyl-CoA Konzentration beträgt 1 mM.

Im Folgenden wurde versucht, das Redoxpotential des  $[\text{4Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Übergangs in Gegenwart von Substrat zu ermitteln. Nachdem die Reduktionskinetik der Dehydratase in Anwesenheit von Crotonyl-CoA bestimmt wurde, konnte die Abhängigkeit der Signalbildung des Oxidationssignals von dem eingestellten Potential der Vorreduktion ermittelt werden. In Abbildung 33 ist das Potential der Vorreduktion gegen die Peakfläche des Oxidationssignals des Eisen-Schwefel-Zentrums aufgetragen und mit der Nernst Funktion gefittet worden. Für das  $[\text{4Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Zentrum der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurde hiermit nach Substratbindung ein Redoxpotential von  $-414 \text{ mV}$  ermittelt. Die Erhöhung des Redoxpotentials durch Substratbindung erklärt, warum in gewöhnlichen Reduktionsexperimenten mit Natriumdithionit die  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren der Dehydratase reduziert werden konnten. Die Substratbindung führt demnach zu einer Verschiebung der Redoxpotentiale der Eisen-Schwefel-Zentren als auch derjenigen des FAD Kofaktors zu positiveren Werten. Dadurch wird das Enzym leichter reduzierbar.

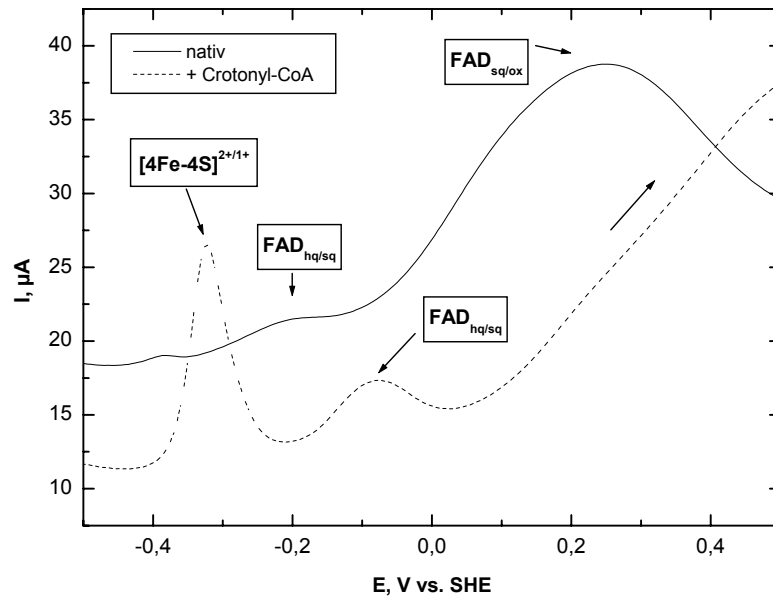


**Abbildung 33: Bestimmung des Redoxpotentials der  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Crotonyl-CoA.** Beachte - In diesem Experiment wurden Square-Wave Voltammogramme anstatt Cyclovoltammogramme der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aufgenommen. Die Vorreduktion betrug jeweils 5 Minuten bei unterschiedlichen Reduktionspotentialen (x-Achse). Die Fläche des Oxidationssignals bei  $-307$  mV wurde gegen das Reduktionspotential aufgetragen und mit der Nernst Funktion gefittet.  $355 \mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Anwesenheit von  $200 \mu\text{g/ml}$  Polymyxin. Die Crotonyl-CoA Konzentration beträgt  $1 \text{ mM}$ .

#### 4.3.2 Dehydrogenase-Aktivität in der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase?

In weiteren elektrochemischen Versuchen mittels Square-Wave Voltammetrie wurden Hinweise auf eine „Dehydrogenase-Aktivität“ der Dehydratase gefunden. In Gegenwart von Crotonyl-CoA wurde ein zuvor nicht beobachteter konstanter Stromfluss beobachtet (Abbildung 34). Ohne Substrat konnte diese Reaktion nicht detektiert werden. Dieser Stromfluss wurde über einen Zeitraum von mehreren Minuten beobachtet, wenn das Potential der Elektrode bei  $+500 \text{ mV}$  fixiert wurde. Crotonyl-CoA wurde mit einem 100-fachen Überschuss zur Enzymkonzentration zugegeben. Dieser Befund kann nur durch eine katalytische Reaktion der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit der Elektrode erklärt werden. Da die Reoxidation des FAD-Semichinons an der Elektrode den Nachschub an Elektronen aus der Peripherie erfordert, muss das Substrat als Elektronendonator fungieren. Die Oxidation von Crotonyl-CoA könnte zur Bildung von 4-Hydroxycrotonyl-CoA führen. Um dieses Intermediat identifizieren zu können, wurde die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Anwesenheit von Crotonyl-CoA für 30 Minuten bei  $+500 \text{ mV}$  an der Elektrode oxidiert und dem Ansatz eine Probe entnommen. Die Probe wurde mittels HPLC und MALDI-

TOF Massenspektrometrie auf CoA-Ester untersucht. Jedoch konnte auf Anhiieb kein 4-Hydroxycrotonyl-CoA identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Untersuchungen nicht fortgeführt werden.

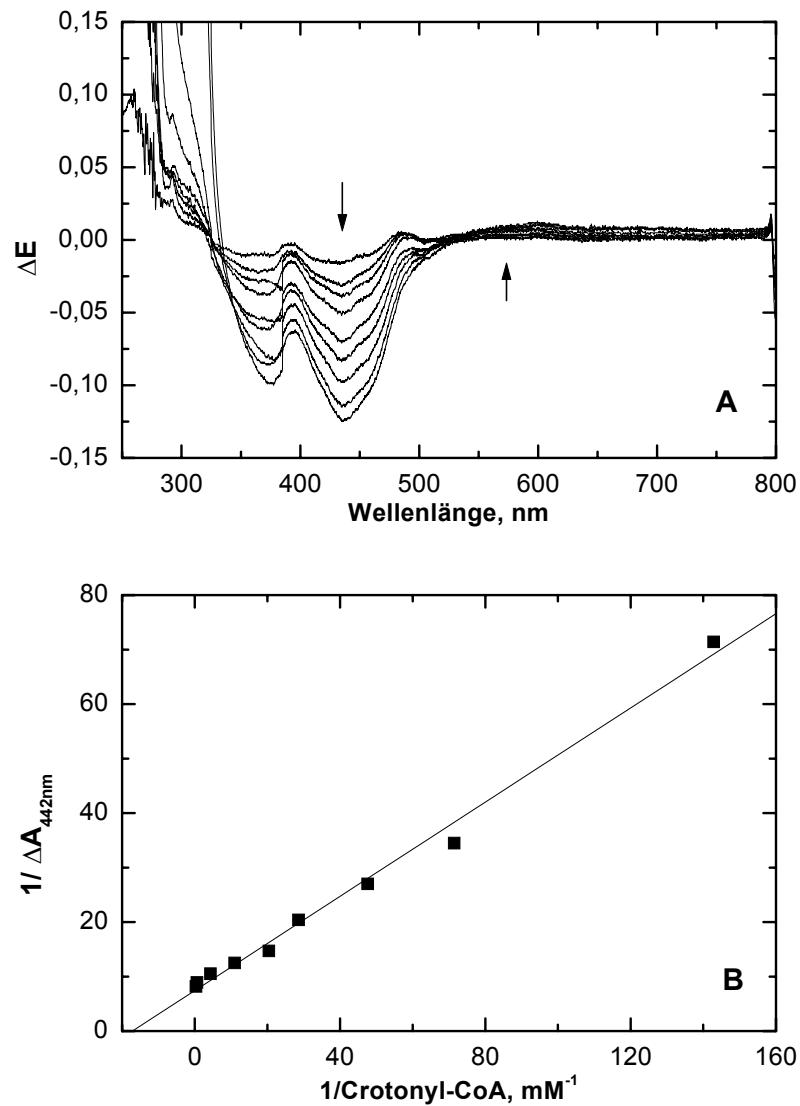


**Abbildung 34: Katalyse an der Elektrode.** Das Square Wave Voltammogramm der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Crotonyl-CoA (gestrichelte Linie) erlaubt die Detektion eines kontinuierlichen Stromflusses im positiven Potentialbereich (Pfeil). Wenn das Potential der Arbeitselektrode auf +500 mV fixiert wurde, konnte der Stromfluss für einen Zeitraum von mindestens 45 Minuten detektiert werden. Zur Kontrolle wurde der Probe das Crotonyl-CoA entnommen, zweimal mit anaerobem Puffer gewaschen und ein Square Wave Voltammogramm aufgenommen (durchgezogene Linie). Die Signale bei -200 mV und +200 mV entsprechen den beiden Flavinübergängen der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ohne Substrat. 355 µM 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Anwesenheit von 200 µg/ml Polymyxin. Die Crotonyl-CoA Konzentration beträgt 1 mM.



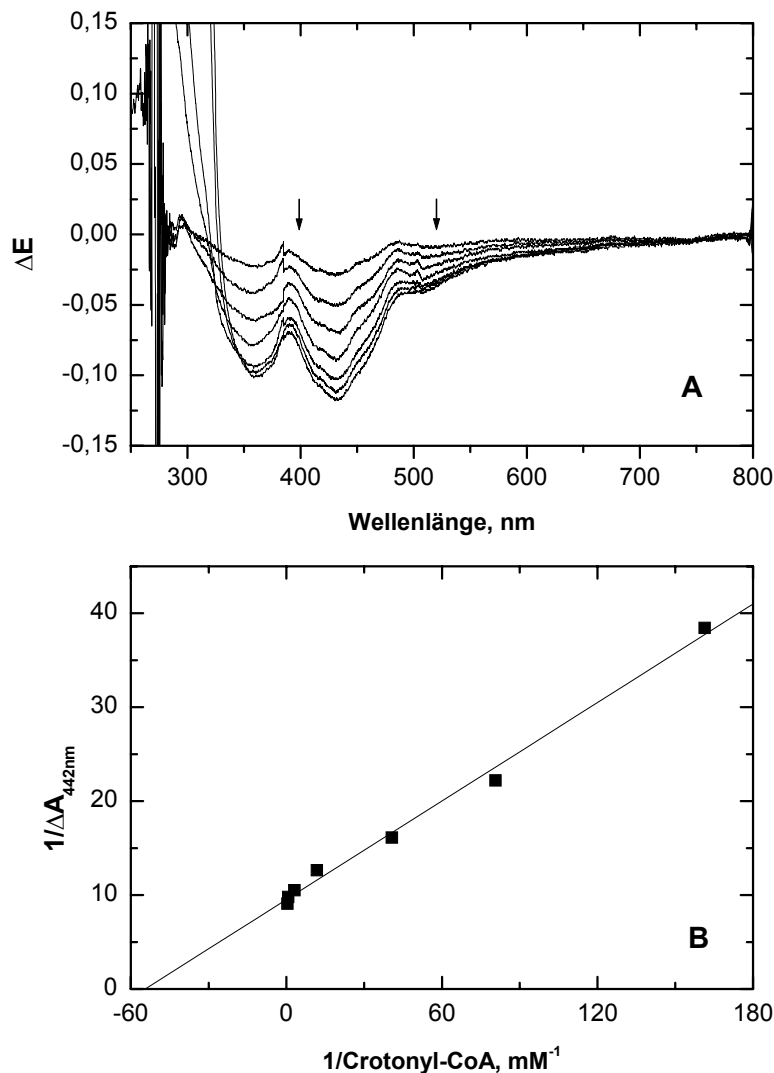
#### 4.3.3 Bestimmung der Dissoziationskonstanten für Crotonyl-CoA und CoASH an aktiver als auch O<sub>2</sub>-inaktivierter Dehydratase

Die Zugabe von Crotonyl-CoA zur 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase führt zu Veränderungen des UV-Vis Spektrums, die für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten für das jeweilige Substrat genutzt werden können. Wie anhand des in Abbildung 28 gezeigten UV-Vis Spektrums der Dehydratase nach Zugabe von Crotonyl-CoA, handelt es sich hierbei zunächst um eine Bleichung des Spektrums im Bereich von 320 nm bis 480 nm und die Ausbildung einer „Charge-Transfer-Bande“ die sich über den Wellenlängenbereich von 500 nm bis 800 nm erstreckt (Abbildung 28, rote Linie). Der Absorptionsanstieg bei 500 nm wurde als FAD-Semichinon Bildung schon im vorherigen Kapitel beschrieben. Es ist anzumerken, dass die Ausprägung der FAD-Semichinonbildung sehr stark von der Enzymqualität abhängig war. Der Absorptionsanstieg im UV-Bereich (<330 nm) entspricht der Absorption des CoA-Esters. Substratbindung führt demnach zu einer Bleichung des UV-Vis Spektrums die durch eine Bindung des Substrates und einer Verschiebung des Redoxgleichgewichts des FAD erklärt werden kann. Die durch Substratbindung verursachte Reorganisation der Elektronendichte auf dem Flavinring, konnte mittels <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektroskopie nachgewiesen werden und wird in dieser Arbeit zu einem späteren Zeitpunkt (Ergebnisse 4.3.5) beschrieben. Auch die zuvor beschriebene Modulation der Redoxpotentiale der Kofaktoren nach Substratbindung passt zu der geringfügigen Absorptionsabnahme des UV-Vis Spektrums, da nur ein geringer Anteil des FAD reduziert worden ist. Die doppelt-reziproke Auftragung der Absorptionsveränderung gegen die Crotonyl-CoA Konzentration erlaubt die Bestimmung der Dissoziationskonstanten  $K_d$ , die für Crotonyl-CoA mit 57  $\mu$ M bestimmt wurde (Abbildung 35).



**Abbildung 35: Differenzspektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nach sukzessiver Zugabe von Crotonyl-CoA.** A) Die jeweiligen Differenzspektren wurden nach Subtraktion des Ausgangspektrums (ohne Substrat) erhalten. B) Lineweaver-Burk Auftragung der Crotonyl-CoA Konzentration gegen die Absorptionsänderung bei 442 nm.

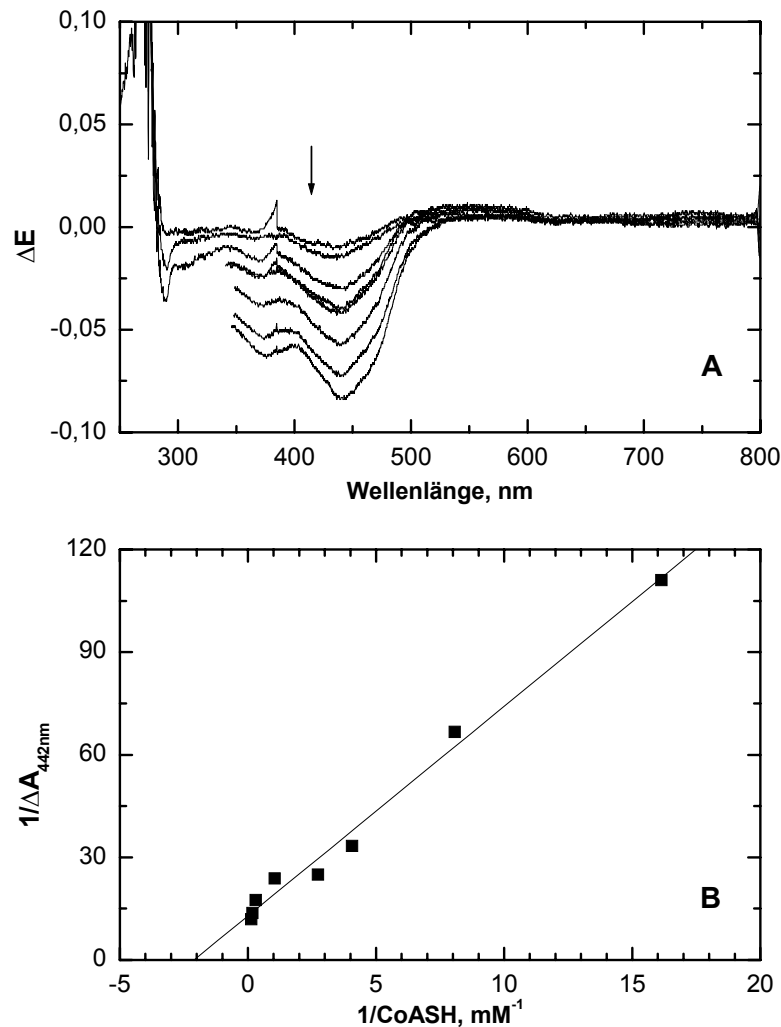
Interessanterweise wurde die Ausbildung der „Charge-Transfer-Bande“ sowie die FAD Radikalbildung bei Luftsauerstoff inaktivierten Präparationen nicht beobachtet. Die Bleichung des Spektrums im Bereich von 320 nm – 480 nm hat sich stattdessen bis zu 700 nm ausgedehnt, wie anhand der Differenzspektren besonders gut zu erkennen ist (Abbildung 36). Mit der Luftsauerstoff inaktivierten Dehydratase konnte eine Dissoziationskonstante von  $K_{d(\text{Crotonyl-CoA})} = 39 \mu\text{M}$  für Crotonyl-CoA ermittelt werden.



**Abbildung 36: Differenzspektren  $\text{O}_2$ -inaktivierter 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nach sukzessiver Zugabe von Crotonyl-CoA.** Die jeweiligen Differenzspektren wurden nach Subtraktion des Ausgangsspektrums (ohne Substrat) erhalten. B) Lineweaver-Burk Auftragung der Crotonyl-CoA Konzentration gegen die Absorptionsänderung bei 442 nm.

Die Titration mit CoASH an aktiven Enzymproben führte auch zu Veränderungen des UV-Vis Spektrums, die sich jedoch von denen mit Crotonyl-CoA unterscheiden (Abbildung 37). In diesem Fall wurde ebenfalls eine Bleichung des Spektrums im sichtbaren Wellenlängenbereich beobachtet. Von 300 nm bis 500 nm wurde eine Absorptionsabnahme detektiert, die für die Bestimmung der Dissoziationskonstante

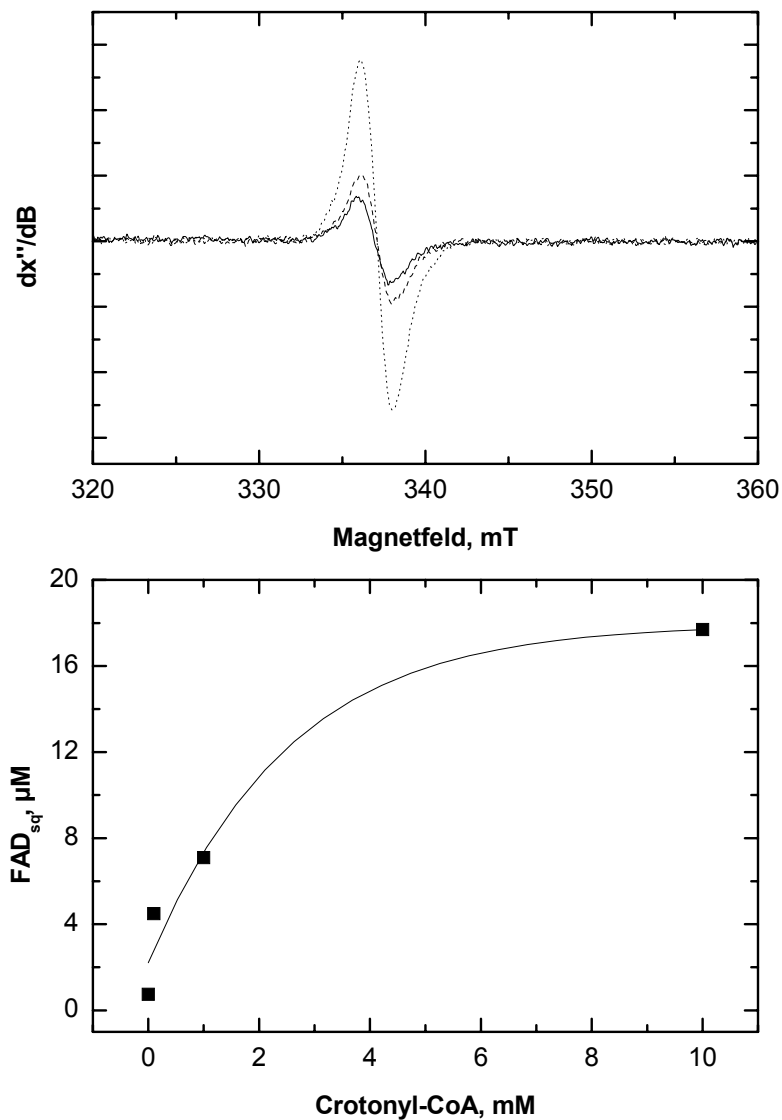
von  $K_{d(\text{CoASH})} = 1,0 \text{ mM}$  diene. Die Bindung von CoASH zur 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ist ca. 20 x schwächer als für Crotonyl-CoA. Die CoASH-Bindung an aktiver 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase verursacht nicht die Ausbildung einer „Charge-Transfer-Bande“ wie es für Crotonyl-CoA der Fall ist.



**Abbildung 37: Differenzspektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nach sukzessiver Zugabe von CoASH.** A) Die jeweiligen Differenzspektren wurden nach Subtraktion des Ausgangspektrums (ohne Substrat) erhalten. B) Lineweaver-Burk Auftragung der CoASH Konzentration gegen die Absorptionsänderung bei 442 nm.

#### 4.3.4 EPR-spektroskopischer Nachweis der Substrat-induzierten FAD-Semichinonbildung in der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

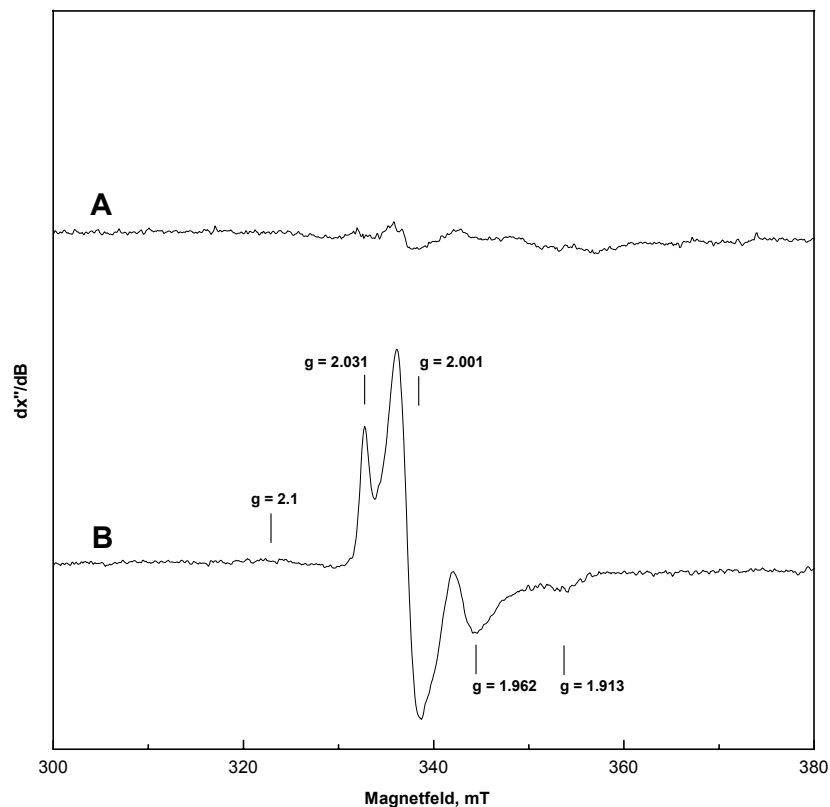
Wie zuvor mittels UV-Vis Spektroskopie schon beobachtet (Ergebnisse 4.3.1), konnte auch mittels EPR-Spektroskopie die Bildung des FAD-Semichinonradikals nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente immer die nicht mit Crotonyl-CoA versetzte Enzymprobe. Die Titration mit Crotonyl-CoA führte zur Bildung des isotropen EPR-Signals mit einem g-Wert von 2,004 (Abbildung. 38).



**Abbildung 38: Substrat induzierte FAD-Semichinonbildung in der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase.** Die Titration von Crotonyl-CoA zu oxidiert vorliegender 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (50 µM) führt zur Bildung eines FAD-Semichinon Radikals (obere Abbildung). Die EPR-Spektren wurden bei einer Temperatur von 77 K, einer Mikrowellenleistung von 0,2 mW und einer Modulations-Amplitude von 0,3 mT aufgenommen. In der unteren Abbildung ist die Ausbeute gegen die Crotonyl-CoA Konzentration aufgetragen.

Die FAD-Semichinon Bildung konnte mit einer steigenden Crotonyl-CoA Konzentration erhöht werden. Erst die Zugabe eines 100-fachen Überschusses an Crotonyl-CoA führt zu einer maximalen Semichinon-Ausbeute. Je nach Präparation wurden 10-15% des gesamten FAD in die Semichinon-Stufe überführt.

Die EPR-Analyse bei Temperaturen  $< 40$  K der Substrat behandelten Dehydratase führte zur Identifizierung weiterer Radikale (Abbildung 39). Das EPR-Spektrum ist sehr wahrscheinlich aus zwei Radikalsignalen zusammengesetzt und wurde zuvor auch in Dehydrataseproben ohne Substrat beobachtet<sup>97</sup>. Es können insgesamt vier g-Werte aus dem Spektrum abgelesen werden, die zu zwei axialen Signalen mit  $g_{xy} = 2,001$  und  $g_z = 2,032$  sowie  $g_{xy} = 1,96$  und  $g_z = 1,91$  zugeordnet werden können (Spektrum B). Dieses EPR-Spektrum konnte nur bei sehr niedrigen Temperaturen ( $< 40$  K) und idealerweise mit hoher Mikrowellenleistung (50 mW) detektiert werden. Aufgrund dieser sehr schnellen Relaxationseigenschaften handelt es sich hierbei wahrscheinlich um Metall-zentrierte Radikale. Aufgrund der großen Linienbreite von 5 mT kann sich hierbei nicht um das FAD-Semichinon handeln.



**Abbildung 39: EPR-Spektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nach Zugabe von Crotonyl-CoA bei 10 K.** 50  $\mu$ M 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in 50 mM Tris/HCl pH 7,5, oxidiert vorliegend (Spektrum A) und nach Zugabe von 4 mM Crotonyl-CoA (Spektrum B). a) EPR Parameter: Mikrowellenleistung 2 mW, Modulations-Amplitude 1 mT, Frequenz 9,46 GHz. b) EPR Parameter: Mikrowellenleistung 20 mW, Modulations-Amplitude 1 mT, Frequenz 9,46 GHz. Die Spinquantifizierung ergab eine Radikalkonzentration von 9,2  $\mu$ M für Spektrum B.

Ursprünglich wurde dieses EPR-Spektrum zu zerstörten Eisen-Schwefel-Zentren zugeordnet<sup>97</sup>. Da es sich hierbei um eine signifikante Crotonyl-CoA-induzierte Radikalbildung in der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hier um aktive Komponenten des Enzyms handelt. Obwohl die Bildung dieser Radikale signifikant ist, sind die ermittelten Spinkonzentrationen von nur 5% am Gesamtprotein sehr gering. Das komplexe EPR-Spektrum verschwindet nach Reduktion mit Natriumdithionit. Demnach können diese Radikale mit Natriumdithionit bei pH 7,5 reduziert werden. Die g-Werte als auch die Form der EPR-Signale konnte jedoch nicht den in der Literatur beschriebenen paramagnetischen Eisen-Schwefel-Zentren oder anderen bekannten Radikalen zugeordnet werden.

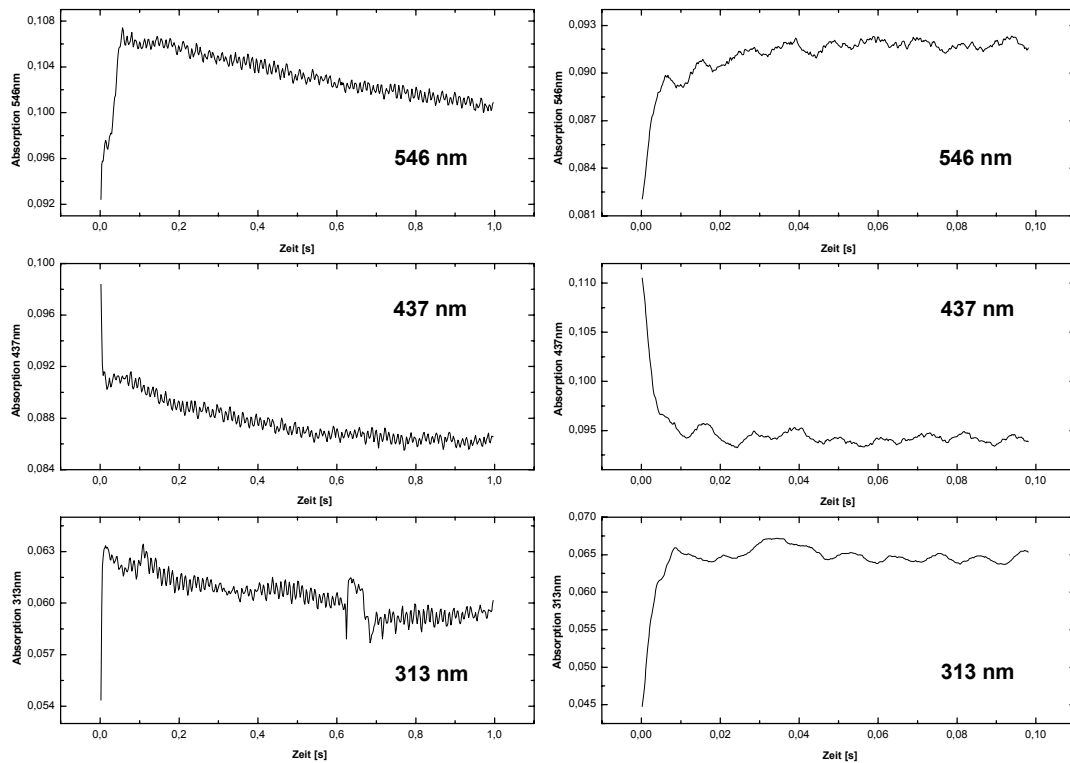
#### 4.3.5 Stopped-flow Analysen der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit verschiedenen Substraten verfolgt mittels UV-Vis Spektroskopie

Zur Identifizierung von transienten Übergangszuständen und deren Geschwindigkeitskonstanten wurden „Stopped-flow“-Analysen der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase durchgeführt. Hierbei wurden neben den natürlichen Substraten 4-Hydroxybutyryl-CoA und Crotonyl-CoA auch die regiospezifisch deuterierten Substrate 4-Hydroxy[2-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA und 4-Hydroxy[3-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA eingesetzt. Die Absorptionsänderungen wurden bei den Wellenlängen 313 nm, 437 nm und 547 nm verfolgt, da die Quecksilber-Bogenlampe bei diesen Wellenlängen ihre Intensitätsmaxima hat und zugleich diese Wellenlängen für die Charakterisierung des FAD und Eisen-Schwefel-Zentrums der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase geeignet sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine „Single-Turnover“-Kinetiken untersucht. Single-Turnover Stopped-flow Analysen werden mit substöchiometrischen Substratkonzentrationen durchgeführt. Da hierbei kein Steady-state erreicht wird, können Rückreaktionen von transient gebildeten Übergangsstufen in die Analysen einbezogen werden.

##### 4.3.5.1 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase plus Crotonyl-CoA

Die schnelle Mischung von oxidiert vorliegender 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (FAD<sub>ox</sub>) mit Crotonyl-CoA unter anaeroben Bedingungen erlaubte die

Detektion von zwei unterschiedlich schnellen Kinetiken bei verschiedenen Wellenlängen (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Beispiele von UV-Vis Stopped-flow Reaktionskurven der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nach Zugabe von Crotonyl-CoA.** Jeweils 100  $\mu\text{l}$  einer 21  $\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase- und 625  $\mu\text{M}$  Crotonyl-CoA Lösung wurden unter anaeroben Bedingungen in einer Stopped-flow Apparatur vermischt und die Kinetik bei einer Wellenlänge von 547 nm (oben), 437 nm (Mitte) und 313 nm (unten) detektiert. Für die im Text angegebenen Wechselraten wurde ein Mittelwert aus jeweils 6 Einzelmessungen herangezogen. Die Totzeit der Apparatur beträgt 2,3 ms. Zur Kontrolle des Systems wurde 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase bzw. Crotonyl-CoA mit anaerobem Puffer vermischt und das Absorptionsverhalten bei den jeweiligen Wellenlängen beobachtet. In diesen Fällen konnten keine Absorptionsänderungen über die hier angegebene Zeit detektiert werden.

Bei einer Wellenlänge von 437 nm konnte eine biphasische Kurve beobachtet werden. Die schnelle Kinetik konnte mit  $k_{\text{obs1}} = 406 \pm 34 \text{ s}^{-1}$ , die langsame mit  $k_{\text{obs2}} = 4,1 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$  mit einer Exponentialfunktion gefittet werden. Bei beiden Reaktionen handelt es sich um eine Absorptionsabnahme. Der Absorptionsunterschied der ersten sehr schnellen Reaktion ist um einen Faktor von 5 größer als die der zweiten Reaktion. Bei einer Wellenlänge von 546 nm wurde ein Absorptionsanstieg und anschliessend eine Absorptionsabnahme detektiert, mit beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von  $k_1 = 397 \pm 16,7 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $k_2 = 1,6 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ . Demnach könnte es sich hierbei um die selben Reaktionen handeln, da die Größenordnungen identisch sind. Die langsame Reaktion wurde nicht immer beobachtet. Auch bei 313 nm wurden zwei Kinetiken detektiert. Mit



einer Reaktionsrate von  $447 \pm 20 \text{ s}^{-1}$  wurde ein Absorptionsanstieg beobachtet, der in der zweiten Reaktion mit einer Rate von  $1,5 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$  leicht zurückging. Demnach können nach der Mischung von 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase und Crotonyl-CoA zwei Reaktionen identifiziert werden, wobei die eine mit ca.  $400 \text{ s}^{-1}$  sehr schnell ist und die andere mit ca.  $1,6 - 4,1 \text{ s}^{-1}$  sehr langsam ist. Aufgrund der apparativen Limitierung könnte die Kinetik der schnellen Reaktion  $> 400 \text{ s}^{-1}$  sein. Die schnelle Reaktion ist mit Absorptionszunahmen bei 313 nm und 546 nm und einer Absorptionsabnahme bei 437 nm verbunden. Diese Veränderungen des Absorptionsspektrums entsprechen den zuvor gezeigten Substrat-Titrations-Versuchen zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten. Darum können die hier detektierten Veränderungen zunächst am einfachsten durch Substratbindung und einer Teilreduktion erklärt werden. Auch bei diesen Versuchen wurde keine quantitative Reduktion der Kofaktoren beobachtet, welche die stöchiometrische Reduktion des FAD oder der Eisen-Schwefel-Zentren durch das Substrat gezeigt hätte. Der Absorptionsanstieg bei 546 nm ist jedoch im Einklang mit der zuvor gezeigten FAD-Semichinon Bildung nach Substratzugabe. Bei der langsamen Reaktion könnte es sich um die transiente Bildung eines Intermediates des Reaktionszyklus handeln, da in weiteren Stopped-flow Versuchen mit regiospezifisch deuterierten Substraten Veränderungen der Geschwindigkeitskonstanten beobachtet wurden.

#### 4.3.5.2 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase plus 4-Hydroxybutyryl-CoA

Zur Kontrolle der zuvor mit Crotonyl-CoA durchgeführten Stopped-flow Analysen wurde zunächst auch das Substrat 4-Hydroxybutyryl-CoA verwendet. Die Vermischung der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit dem 4-Hydroxybutyryl-CoA führte auch zur Detektion von zwei Reaktionen, wobei die eine mit einer Halbwertszeit von ca. 5 ms wieder sehr schnell ist. Für diese Reaktion wurde bei mehreren Wellenlängen  $k_{\text{obs}1} = \text{ca. } 400 \text{ s}^{-1}$  detektiert. Für die zweite Reaktion wurde  $k_{\text{obs}2} = \text{ca. } 13 \text{ s}^{-1}$  bestimmt. Die schnelle Reaktion äusserte sich in einer Absorptionsabnahme bei 437 nm, wohingegen bei 313 nm und 547 nm eine Absorptionszunahme detektiert werden konnte. Es handelt sich bei dieser Reaktion um ein ähnliches Absorptionsverhalten wie nach Zugabe von Crotonyl-CoA mit vergleichbarer Reaktionsgeschwindigkeit und kann als Substratbindung interpretiert werden.

Die langsame Reaktion zeigte eine Absorptionsabnahme bei 313 nm und 547 nm und eine Absorptionszunahme bei 437 nm mit  $k_{\text{obs}} = 12 \text{ s}^{-1}$ . Im Gegensatz wurde bei den Stopped-flow-Versuchen mit Crotonyl-CoA eine signifikante

Absorptionsabnahme bei 437 nm detektiert. Dieser Befund wurde mehrmals reproduziert. Unter diesen Bedingungen müsste eigentlich die Zugabe von Substrat bzw. Produkt zu identischen Absorptionsänderungen führen, vorausgesetzt es handelt sich hierbei um dieselbe Spezies. Interessant ist jedoch, dass mit 4-Hydroxybutyryl-CoA die Geschwindigkeitskonstante 4x größer war als mit Crotonyl-CoA. Auch die Veränderungen bei 313 nm und 547 nm nach Zugabe von 4-Hydroxybutyryl-CoA waren mit  $k_{\text{obs}} = 13 \text{ s}^{-1}$  (313 nm) und  $9,9 \text{ s}^{-1}$  (547 nm) 4x schneller als mit Crotonyl-CoA. Dieser Faktor entspricht der bekannten Gleichgewichtskonstante für die Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA, die mit 4:1 auf der Seite von Crotonyl-CoA liegt<sup>11</sup>.

#### 4.3.5.3 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit 4-Hydroxy[2-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA und 4-Hydroxy[3-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA

Weitere „pre-steady-state“-Analysen sollten klären, ob die Verwendung von regiospezifisch deuterierten Substraten Veränderungen in den beobachteten Geschwindigkeitskonstanten induzieren. Die Vermischung der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit 4-Hydroxy[2-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA zeigte eine sehr schnelle Kinetik mit ca.  $400 \text{ s}^{-1}$  und eine langsame Kinetik von  $1,8 \text{ s}^{-1} - 3,4 \text{ s}^{-1}$ . Die Absorptionsveränderungen für die schnelle Reaktion entsprechen denen nach Zugabe von 4-Hydroxybutyryl-CoA und zeigen keinen Isotopeneffekt. Bei einer Wellenlänge von 313 nm wurde eine langsame Reaktion detektiert, die eine signifikante Veränderung der Absorption aufzeigte. Hier wurde eine Absorptionszunahme detektiert, mit  $k_{\text{obs}} = 1,8 \text{ s}^{-1}$ , wohingegen die Verwendung von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu einer Absorptionabnahme mit  $k_{\text{obs}} = 13 \text{ s}^{-1}$  geführt hatte. Interessanterweise wurden mit Crotonyl-CoA ähnliche Geschwindigkeitskonstanten beobachtet wie in Gegenwart von 4-Hydroxy[2-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA. Aufgrund der qualitativen Veränderungen der Absorption, kann hier nicht mit Sicherheit von einem Isotopeneffekt gesprochen werden. Vielmehr kann angenommen werden, dass die Verwendung von 4-Hydroxy[2-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA die kinetischen Eigenschaften der Dehydratase verändert und die Detektion von transienten Enzym:Substrat bzw. Enzym:Produkt-Spezies erlaubt, welche mit dem natürlichen Substrat nicht beobachtet wurde. In früheren Untersuchungen mit 4-Hydroxy[2-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA als Substrat wurde unter „steady-state“-Bedingungen ein Deuterium-Isotopeneffekt von  $2,0 \pm 0,1$  bestimmt. Dieser primäre Isotopeneffekt wurde der Abstrahierung des  $\alpha$ -Wasserstoffs zugeordnet<sup>100</sup>. Da diese Art von Deprotonierungen gewöhnlich mit Geschwindigkeitskonstanten von ca.  $1000 \text{ s}^{-1}$  ablaufen<sup>132</sup>, muss es sich

hierbei um eine andere Reaktion handeln. Ein weiterer Unterschied zu den Stopped-flow-Versuchen mit dem natürlichen Substrat liegt darin, dass bei einer Wellenlänge von 547 nm keine zweite langsame Reaktion detektiert werden konnte. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Absorptionsänderungen mit 4-Hydroxy[2-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA als Substrat modifiziert sind. Zudem wurden für die sekundäre Reaktion langsamere Geschwindigkeitskonstanten beobachtet; wohingegen die schnelle Reaktion mit 400 s<sup>-1</sup> unverändert blieb. Dieser Befund ist nicht im Einklang mit dem für die Abstrahierung des  $\alpha$ -Wasserstoffs beschriebenen primären Isotopeneffekt.

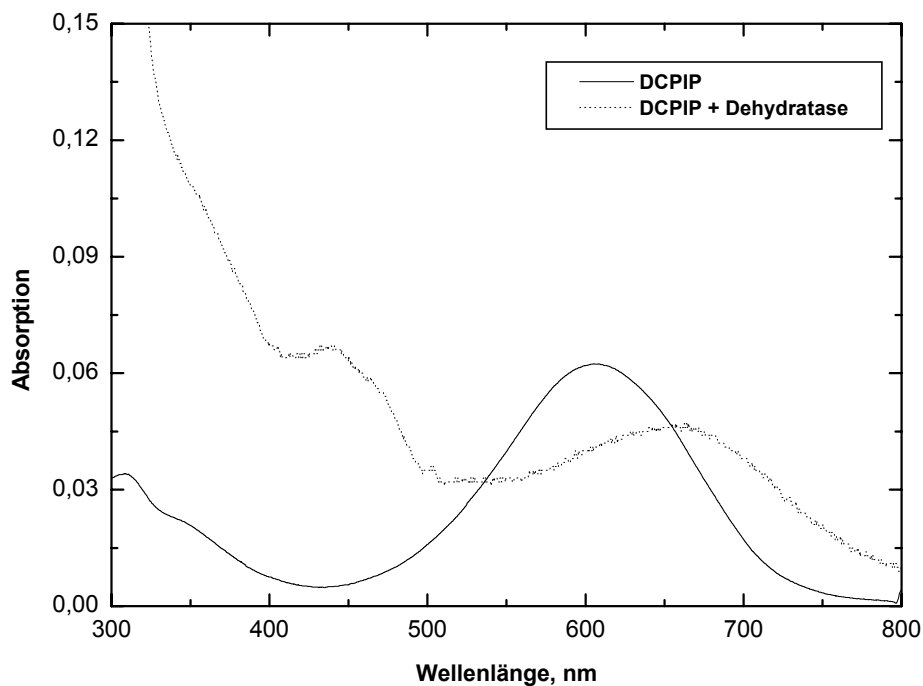
Die Verwendung von 4-Hydroxy[3-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA als Substrat zeigte zunächst auch zwei Reaktionen. Die Absorptionsveränderungen für die schnelle Reaktion entsprechen denen des natürlichen Substrats und weisen ein  $k_{\text{obs}}$  von 400 s<sup>-1</sup> auf. Demnach kann auch mit diesem Substrat kein Isotopeneffekt für diese Reaktion beobachtet werden. Im Weiteren wurde mit einer Absorptionsabnahme bei 547 nm eine Wechselrate von 5,6 s<sup>-1</sup> detektiert. Wie schon zuvor mit 4-Hydroxy[2-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA als Substrat ist auch mit diesem Substrat die sekundäre Kinetik langsamer als mit dem natürlichen Substrat 4-Hydroxybutyryl-CoA. Die Geschwindigkeitskonstante ist um einen Faktor von 1,8 kleiner, mit 4-Hydroxy[2-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA wurde ein Faktor von 3,5 beobachtet. Dieser Deuterium-Isotopeneffekt konnte dagegen bei einer Wellenlänge von 437 nm nicht detektiert werden, da hier ein Absorptionsanstieg mit 13 s<sup>-1</sup> ermittelt wurde. Dieser Wert entspricht dem für das natürliche Substrat. Der Absorptionsanstieg bei 313 nm, welcher im Profil dem Verhalten mit 4-Hydroxy[2-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA ähnlich ist, ist mit einer Wechselrate von 4,3 s<sup>-1</sup> zwar um einen Faktor von 2,4 größer im Vergleich zu 4-Hydroxy[2-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA, jedoch konnte mit dem natürlichen Substrat nur eine Absorptionsabnahme mit 13 s<sup>-1</sup> detektiert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass auch die Absorptionsänderungen mit 4-Hydroxy[3-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA als Substrat modifiziert sind. Es wurde bei einer Wellenlänge von 547 nm ein Deuterium-Isotopeneffekt von 1,8 für die langsame Reaktion ermittelt. Bei einer Wellenlänge von 437 nm wurde kein Deuterium-Isotopeneffekt beobachtet, wie zuvor mit 4-Hydroxy[2-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA.

Diese Daten können nicht mit dem im „steady-state“ beobachteten Ergebnissen in Einklang gebracht werden. Die schnelle Kinetik mit > 400 s<sup>-1</sup> erlaubte wiederum keine Aussage, da sie sich nicht von der mit natürlichem Substrat unterscheidet. Da bei diesen schnellen Kinetiken die Genauigkeit der Stopped-flow-Apparatur limitierend ist, können geringfügige Isotopeneffekte nicht detektiert werden.

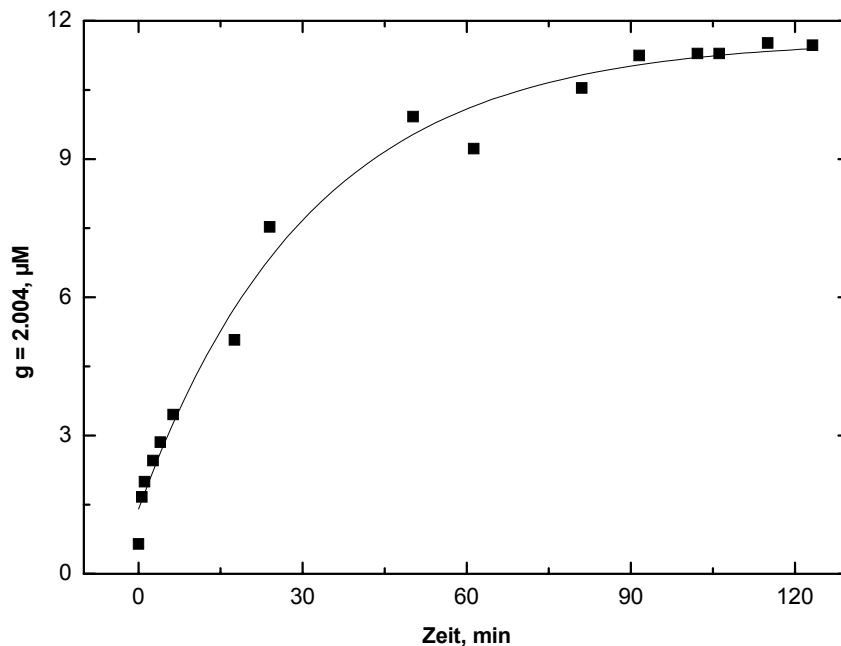
#### 4.3.6 Substrat induzierte Radikalbildung in der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Dichlorophenolindophenol

Dehydrataseproben die zuvor mit Dichlorophenolindophenol (DCPIP) bzw. Kaliumhexacyanoferrat reoxidiert und anschließend mit Crotonyl-CoA in Gegenwart dieser Oxidationsmittel versetzt wurden, führten zur Bildung des FAD-Semichinonradikals. Mittels UV-Vis Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass DCPIP an die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase bindet. Aufgrund einer bathochromatischen Verschiebung des DCPIP-Spektrums konnte die Bindung an die Dehydratase nachgewiesen werden. Das Absorptionsmaximum von oxidiertem DCPIP bei neutralem pH-Wert liegt bei 610 nm, wohingegen das enzymgebundene DCPIP ein Absorptionsmaximum bei 650 nm aufweist (Abbildung 41). Die Bindung von DCPIP wurde zuvor schon für das Metalloflavoenzym Xanthin-Oxidase beschrieben<sup>133</sup>.



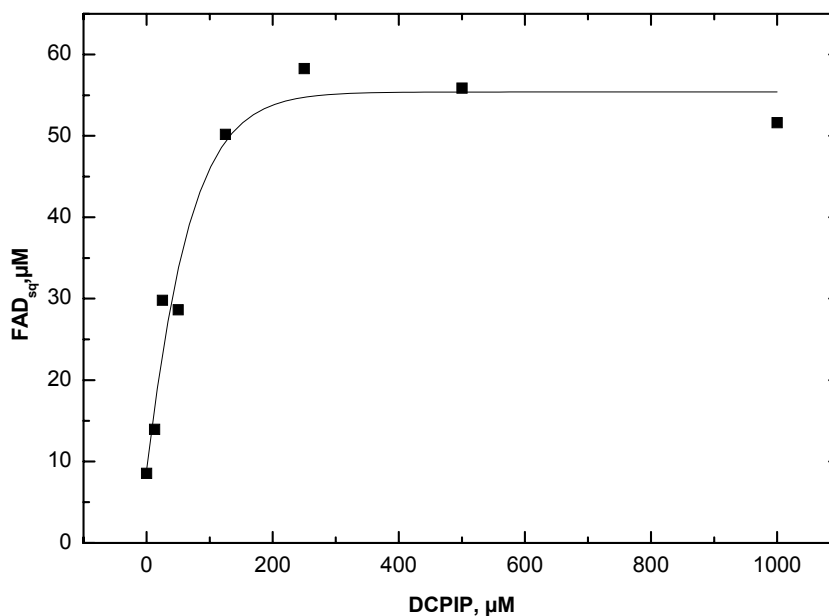
**Abbildung 41: UV-Vis Spektrum der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nach DCPIP-Bindung.** 19,2  $\mu$ M 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurde mit 1 mM DCPIP versetzt und über eine Sephadex-G25 Gelfiltrationssäule aufgereinigt. Das Spektrum stammt von dem Proteinpeak der Säule.

Die Titration einer 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrataseprobe bei Anwesenheit von DCPIP im Überschuß zur Enzymmenge führt zur Bildung des isotropen EPR-Signals mit einem g-Wert von 2,004 und einer Linienbreite von 2 mT. Dieses EPR-Signal entspricht weitgehend dem zuvor beschriebenen, mit Reduktionsmitteln erzeugtem FAD-Semichinon der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase. Die Ausbildung dieses Radikalsignals bei Raumtemperatur erfolgte innerhalb von fünf Minuten. Um die Radikalkinetik verfolgen zu können wurde ein Ansatz bei 4°C inkubiert und die Bildung des Radikals zu gegebenen Zeitpunkten mittels EPR-Spektroskopie verfolgt. Unter diesen Bedingungen wurde nach 90 Minuten die maximal mögliche Menge an FAD-Semichinon erhalten (Abbildung 42). Interessanterweise ist das Radikal resistent zu Luftsauerstoff, da in einem Zeitrahmen von 10-20 Minuten nur 20% der Signalintensität verloren ging, wenn die Proben nach Zugabe von Crotonyl-CoA an Luft exponiert wurden.



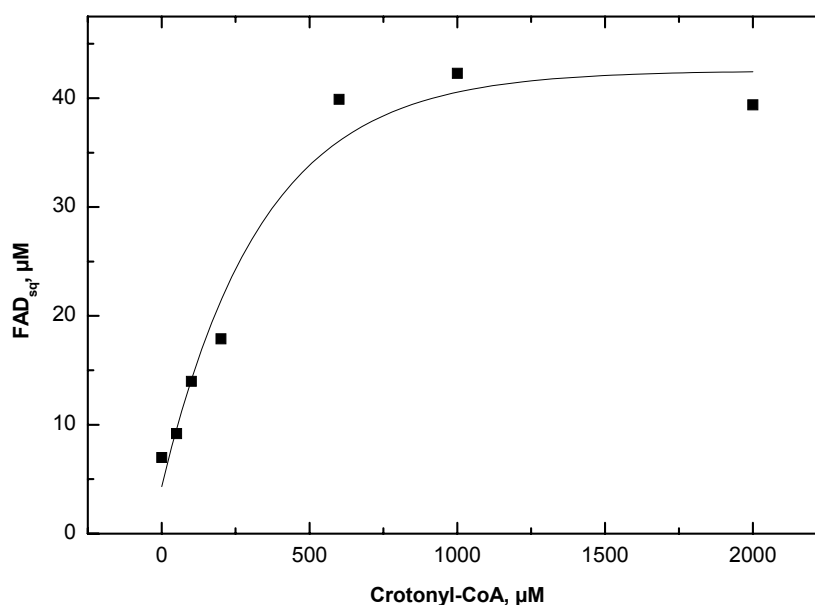
**Abbildung 42: FAD-Semichinonbildung der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Dichlorophenolindophenol und Crotonyl-CoA bei 4°C.** 14 µM 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (6,5 U/mg) wurde mit 1mM DCPIP und 1,5 mM Crotonyl-CoA unter anaeroben Bedingungen bei 4°C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die EPR-Spektren bei 77 K ermittelt und die Spinausbeute des isotropen Radikalsignals gegen die Zeit aufgetragen. Die EPR-Spektrometer Parameter entsprechen denen in Abbildung 38.

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass mindestens ein 10-facher DCPIP-Überschuss zur Enzymmenge vorliegen muss, um die maximal mögliche Radikalmenge zu generieren (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Dichlorophenolindophenol-Abhängigkeit der FAD-Semichinonbildung der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Crotonyl-CoA.** 20 µM 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (12,5 U/mg) wurde mit 1,5 mM Crotonyl-CoA und definierten Mengen an DCPIP unter anaeroben Bedingungen bei 18 °C für 10 Minuten inkubiert. Aus diesem Ansatz wurden Proben entnommen und bei 77 K EPR-Spektren aufgenommen. Die EPR-Spektrometer Parameter entsprechen denen in Abbildung 38. Die Spinquantifizierung des isotropen Radikals (FAD-Semichinon) ist gegen die DCPIP Konzentration aufgetragen.

Es ist anzumerken, dass die Inkubation der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit DCPIP zu keinem Aktivitätsverlust führte. Im Gegenteil, die Enzympräparationen wiesen oftmals eine leicht erhöhte Enzymaktivität von bis zu 20% auf. Im Folgenden wurde die Substratabhängigkeit dieser Radikalbildung überprüft. Die Bildung des isotropen Radikalsignals ist abhängig von der zugesetzten Crotonyl-CoA Konzentration (Abbildung 44). Jedoch wurde erst bei einem Substrat:Enzym Verhältnis von 50:1 die maximal mögliche Radikalkonzentration erreicht. Eine weitergehende Analyse zur eindeutigen Charakterisierung dieses isotropen Radikals wurde mit Hochfrequenz-EPR-Spektroskopie und  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektroskopie durchgeführt (siehe Ergebnisse 4.3.5 und 4.3.6). Mittels dieser Techniken sollte durch eine verbesserte Auflösung der EPR-Spektren die Existenz weiterer Radikale überprüft werden. EPR-Untersuchungen bei Temperaturen von  $< 40\text{ K}$  gaben keine Hinweise auf die Bildung weiterer Radikale. Somit kann unter diesen Bedingungen ein Elektronentransfer zu den  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

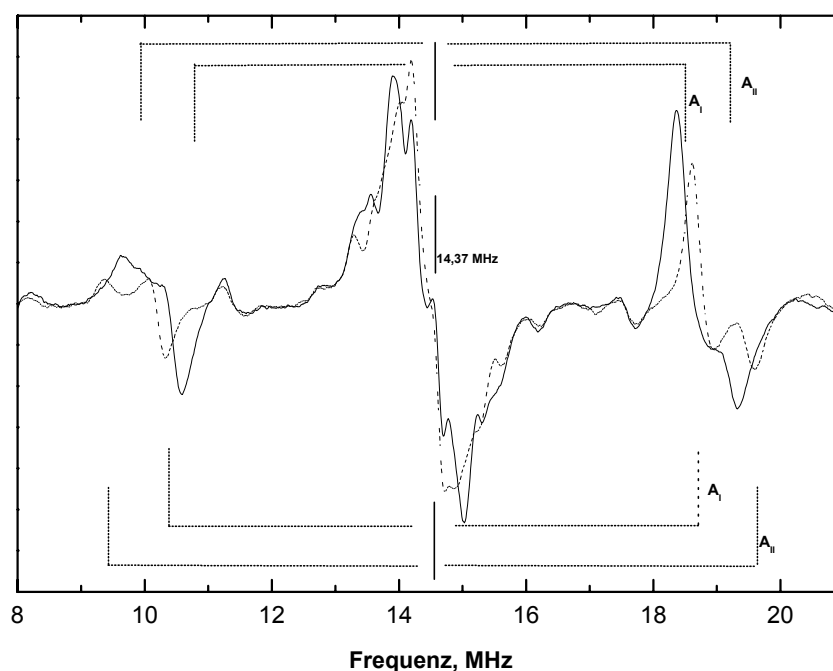


**Abbildung 44: Substrat-Abhängigkeit der FAD-Semichinonbildung der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von DCPIP.** 20  $\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (12,5 U/mg) wurde mit 1 mM DCPIP und definierten Mengen an Crotonyl-CoA unter anaeroben Bedingungen bei 18°C für 10 Minuten inkubiert. Aus diesem Ansatz wurden Proben entnommen und bei 77 K EPR-Spektren aufgenommen. Die EPR-Spektrometer Parameter entsprechen denen in Abbildung 38. Die Spinquantifizierung des isotropen Radikals (FAD-Semichinon) ist gegen die Crotonyl-CoA Konzentration aufgetragen.

#### 4.3.7 ENDOR-Spektren des FAD-Semichinon der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit und ohne Substrat

Zur weiteren Charakterisierung des FAD-Semichinons der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurden  $^1\text{H}$ -ENDOR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurde das FAD der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit Natriumdithionit zur Semichinon Stufe reduziert. Aufgrund des zuvor beschriebenen ungewöhnlichen Relaxationsverhaltens des FAD-Semichinons der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurden die ENDOR-Spektren bei einer Temperatur von 90 K aufgenommen wurden, welche niedriger ist als gewöhnlich für Flavin Semichinone verwendet wird. Das  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektrum der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase zeigt ein für Flavoenzyme charakteristisches Muster an Hyperfeinkopplungskonstanten<sup>134-136</sup> (Abbildung 45, durchgezogene Linie). Ähnliche Hyperfeinkopplungskonstanten wurden für andere neutrale Flavin Semichinone beschrieben<sup>135</sup>. Die Zuordnung der Protonen der C8-Methylgruppe als auch des Protons am C6 des Flavinringes konnte eindeutig erfolgen und ist in der Tabelle 7 zusammengestellt.

Die Zugabe von 4-Hydroxybutyryl-CoA führt zu signifikanten Veränderungen des  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektrums (Abbildung 45, gestrichelte Linie). Es wurden Veränderungen der Hyperfeinkopplungskonstanten in der sogenannten „Matrix-Region“, die relativ schwache Wechselwirkungen des Radikals mit den Protonen des Lösungsmittels als auch mit Protonen von Aminosäureresten bzw. schwach koppelnden Protonen des Flavinringes darstellen, beobachtet. Zudem wurde eine Vergrößerung der Hyperfeinkopplungskonstante der C8-Methylprotonen um 0,5 MHz detektiert. Die schärfere Linienform, insbesondere die der C8-Methylgruppe, des  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektrums der Substrat-gebundenen Dehydratase lässt darauf schließen, dass vorwiegend eine bestimmte Konformationsspezies in dieser eingefrorenen Probe vorliegt. Die Zugabe von Substrat zu der teilweise reduziert vorliegenden 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase führt demnach zu signifikanten Veränderungen des  $^1\text{H}$ -ENDOR-Spektrums die mit einer Verschiebung der Elektronendichte auf dem Flavinring in Richtung der C8-Methylgruppe zu erklären sind.



**Abbildung 45:**  $^1\text{H}$ -ENDOR Spektren des FAD-Semichinon der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in der Abwesenheit (durchgezogene Linie) und Anwesenheit (gestrichelte Linie) von Crotonyl-CoA. Die zwei Hyperfine Komponenten,  $A_{||}$  und  $A_{\perp}$  der 8- $\text{CH}_3$  Protonen, gezeigt als vertikale Linien, wurden nach Substrat Bindung verschoben. 0,93 mM 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase und 0,67 mM 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase plus 15 mM 4-Hydroxybutyryl-CoA. Temperatur, 90 K, Magnetfeld, 337,6 mT, Mikrowellenleistung 20 mW, Frequenz 9,46 GHz, Radiofrequenz-Modulation 70 MHz. Die Zuordnung der Protonen der Methylgruppe am Kohlenstoff 8 als auch das Proton am Kohlenstoff 6 des Flavinrings konnte eindeutig erfolgen und ist in der Tabelle 7 zusammengestellt.

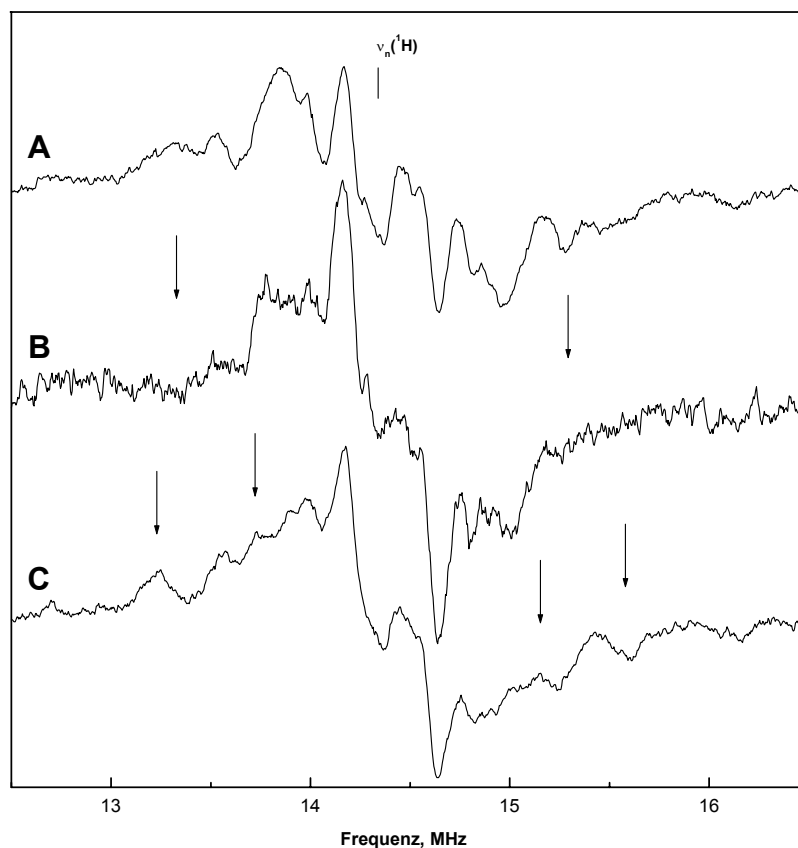


Im Vergleich dazu wurde für die Semichinone der Flavoproteine Ferredoxin-NADP-Reduktase und der Cholesterol-Oxidase eine Verringerung der Hyperfeinkopplungskonstante nach Zugabe der jeweiligen Substrate beobachtet (Tabelle 7). Demnach wird bei diesen Enzymen die Elektronendichte des Flavinringes in die entgegengesetzte Richtung verschoben. Für die Cholesterol Oxidase ist dieser Befund im Einklang mit der Kristallstruktur. Der Pyrimidin Bereich des Isoalloxazinringsystems fungiert hier als Elektronenfalle. Die Verschiebung der Elektronendichte kann zu Veränderungen des Redoxpotentials führen<sup>76,147</sup>. Dieser Befund ist ein weiterer Hinweis für die Modulation des FAD-Redoxpotentials der Dehydratase durch Substratbindung.

**Tabelle 7: Hyperfine Kopplungen zu Flavin Protonen, MHz**

Enzym	8-CH <sub>3</sub>			6-CH
	A <sub>⊥</sub>	A <sub>  </sub>	A <sub>iso</sub>	A <sub>iso</sub>
4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase	7,9	9,69	8,5	6,23
+ 4-Hydroxybutyryl-CoA	8,38	10,24	9,0	6,23
Ferredoxin NADP Reduktase	7,47	9,41	8,12	5,11
+ NADP	7,06	9,04	7,72	5,11
Flavodoxin	7,59	9,48	8,22	5,53
Cholesterol Oxidase	12,11	10,3	10,9	9,0
+ Dehydroisoandrosteron	11,12	9,29	9,92	9,0

Des weiteren wurden die Substrat-induzierten Veränderungen in der Matrix-Region des <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrums charakterisiert. Auch hier wurden signifikante Veränderungen beobachtet. Es sind neue Hyperfeinkopplungskonstanten zu erkennen (Abbildung 46). Hierbei handelt es sich vorwiegend um Protonen aus dem Lösungsmittel und Protonen von Aminosäureresten. Durch die Überführung der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in D<sub>2</sub>O-Puffer können die austauschbaren Protonen entfernt werden. Dies führt zu einem <sup>1</sup>H-ENDOR-Spektrum des FAD-Semichinon ohne den Beitrag der erwähnten Protonen (Abbildung 46, Spektrum B). Die Zugabe von Substrat zeigt zwar signifikante Veränderungen in der Matrix-Region, jedoch konnte keine Zuordnung zu bestimmten Protonen erfolgen.

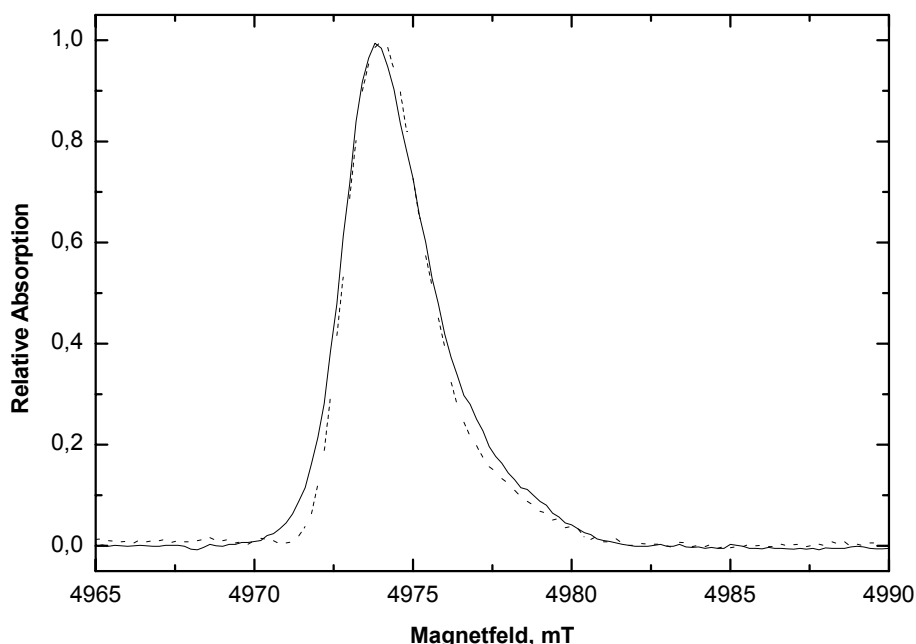


**Abbildung 46:  $^1\text{H}$ -ENDOR Spektren (Matrix) des FAD-Semichinon der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase.** Spektrum A: 0,93 mM 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in  $\text{H}_2\text{O}$ . Spektrum B: 0,43 mM 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in  $\text{D}_2\text{O}$ . Spektrum C: 0,67 mM 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in  $\text{H}_2\text{O}$  plus 15 mM 4-Hydroxybutyryl-CoA. Temperatur, 90 K, Magnetfeld, 337,6 mT, Mikrowellenleistung 20 mW, Frequenz 9.46 GHz, Radiofrequenz Modulation 70 MHz (Die Pfeile deuten auf die Veränderungen in der Matrix-Region nach Pufferwechsel bzw. Substratzugabe).

Durch den Einsatz von regiospezifisch deuterierten Substraten wurde versucht, die neu entstandenen Hyperfeinkopplungskonstanten den Protonen des Substrats zuzuordnen, jedoch ohne Erfolg. Dies wäre nur dann möglich gewesen, wenn das Substrat in unmittelbarer Nähe von ca. 4-6 Å zum Flavinring angeordnet ist oder gar eine kovalente Bindung mit dem FAD eingegangen wäre (D. E. Edmondson, persönliche Mitteilung). Zudem könnten die Deuterien mit dem Lösungsmittel ausgetauscht worden sein, so dass unter diesen Bedingungen eine Veränderung der Hyperfeinkopplungskonstanten nicht beobachtet werden kann. Weitere ENDOR-Untersuchungen des FAD-Semichinon der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase, welche durch die Zugabe von Crotonyl-CoA in Gegenwart von DCPIP induziert wurde, zeigten keine Unterschiede zu den Spektren des FAD-Semichinon welche mit Natriumdithionit generiert wurden. Zur eindeutigen Klärung wurden Hochfeld-EPR-Versuche durchgeführt.

#### 4.3.8 Hochfrequenz-EPR Analysen (140GHz) der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Crotonyl-CoA

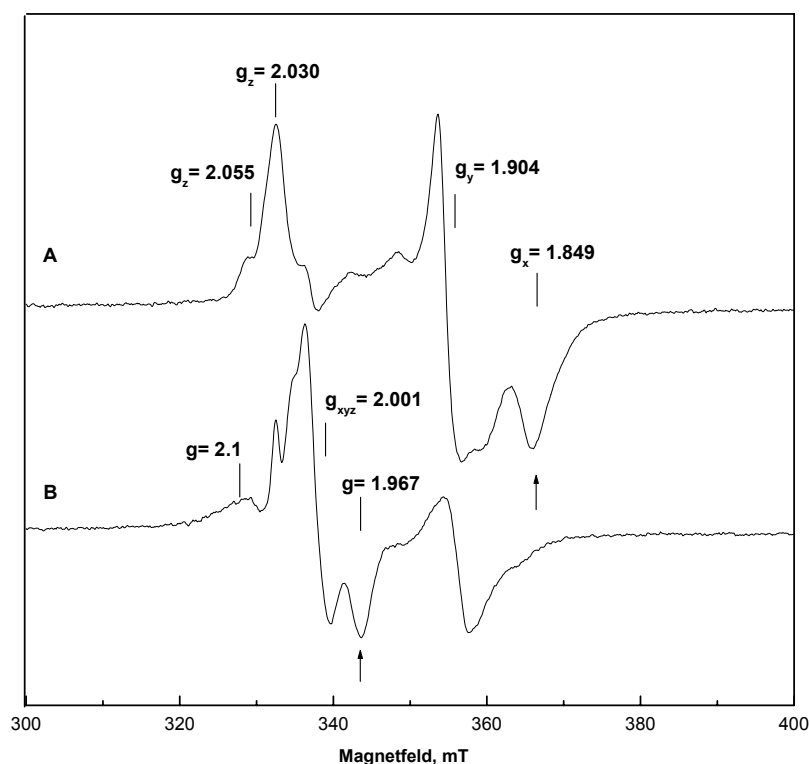
Die X-Band EPR Spektren bei 77K des mit Natriumdithionit bzw. Crotonyl-CoA plus DCPIP generierten Radikals wiesen keinerlei Unterschiede in ihren physikalischen Eigenschaften auf. Zudem war es nicht möglich Unterschiede im  $^1\text{H}$ -ENDOR zu detektieren. Da jedoch viele organische Radikale sehr ähnliche g-Werte im Bereich von 2,00 aufweisen und die Linienbreite des FAD-Semichinon relativ groß ist, könnten weitere organische Radikale mit geringer Linienbreite unbemerkt vorliegen. Durch die Wahl eines EPR-Spektrometers mit einer höheren Frequenz, kann eine bessere Auflösung erzielt werden. Aus diesem Grund wurden 140GHz-EPR-Spektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nach Reduktion mit Natriumdithionit zum FAD-Semichinon mit dem Semichinon-ähnlichen EPR-Signal nach Zugabe von Crotonyl-CoA und DCPIP aufgenommen und verglichen (Abbildung 47). Die 140GHz-EPR-Spektren zeigen keine signifikanten Unterschiede. Daher ist anzunehmen, dass es sich hierbei um zwei identische Radikale handelt. Aufgrund dieser Daten kann die Existenz eines anderen organischen Radikals mit ähnlicher Linienform und äquivalenter Quantität sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden.



**Abbildung 47: 140GHz-EPR-Spektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase.** Die Natriumdithionit-Probe (durchgezogene Linie) und Crotonyl-CoA/DCPIP-Probe (gestrichelte Linie) wurde wie zuvor beschrieben hergestellt. Die Proteinkonzentration betrug 340  $\mu\text{M}$ . Die EPR-Spektren sind als Absorptionssignale dargestellt, und nicht wie üblich als erste Ableitung der Absorption (siehe auch <sup>105</sup>).

#### 4.3.9 Charakterisierung der $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Crotonyl-CoA mittels EPR- und Mössbauer-Spektroskopie

Die Zugabe von Crotonyl-CoA zur Dehydratase führt nicht zu einer quantitativen Reduktion der  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren, wie schon mittels EPR- und Mössbauer-Spektroskopie gezeigt werden konnte<sup>97,98</sup>. Die EPR-spektroskopische Charakterisierung der Eisen-Schwefel-Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Crotonyl-CoA und einer anschliessenden Reduktion mit Natriumdithionit führte jedoch zu signifikanten Veränderungen der zuvor ohne Substrat beobachteten rhombischen EPR-Signale (Abbildung 48, B).

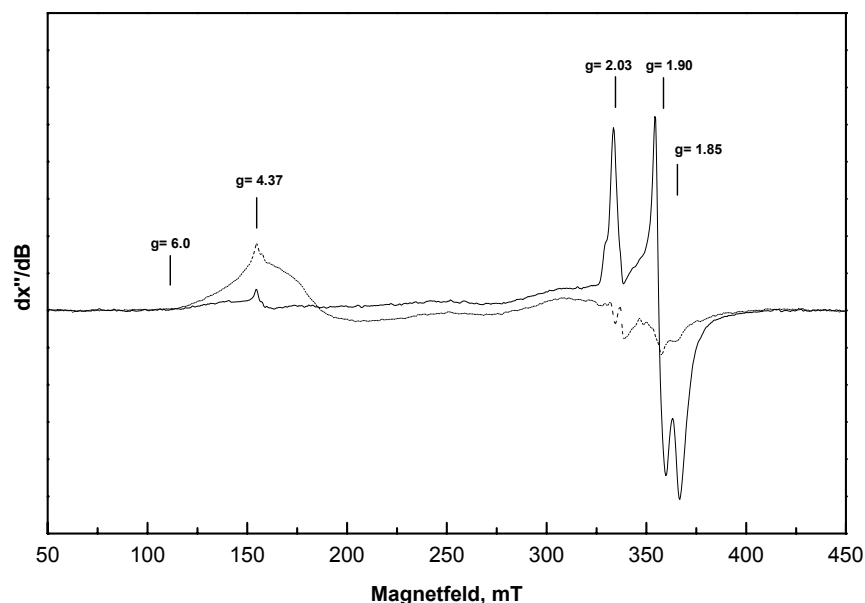


**Abbildung 48: EPR-Spektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit und ohne Crotonyl-CoA bei 10K.** Die Proben bestehen jeweils aus 100  $\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Bicine-Puffer pH 8,5 plus 1 mM Natriumdithionit (Spektrum A); Nach Zugabe von 3 mM Crotonyl-CoA und 1 mM Natriumdithionit (Spektrum B). Die Reduktionsdauer betrug jeweils 10 Minuten. EPR-Spektrometer Parameter: Mikrowellenfrequenz 9,45 GHz, Mikrowellenleistung 2 mW, Modulations-Amplitude 1 mT.

Die hier gezeigte Dehydrataseprobe (100  $\mu\text{M}$ ) wurde in Gegenwart von 3 mM Crotonyl-CoA für 10 Minuten mit 1 mM Natriumdithionit reduziert. Das EPR-Spektrum mit Crotonyl-CoA weist neben dem rhombischen EPR-Signal ( $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ ) zusätzliche EPR-Linien im Bereich von  $g = 2,0$  auf. Bei  $g = 2,1$  ist zusätzlich eine breite Resonanzlinie zu erkennen. Dieses EPR-Spektrum zeigt neben dem reduzierten  $[4\text{Fe-}$

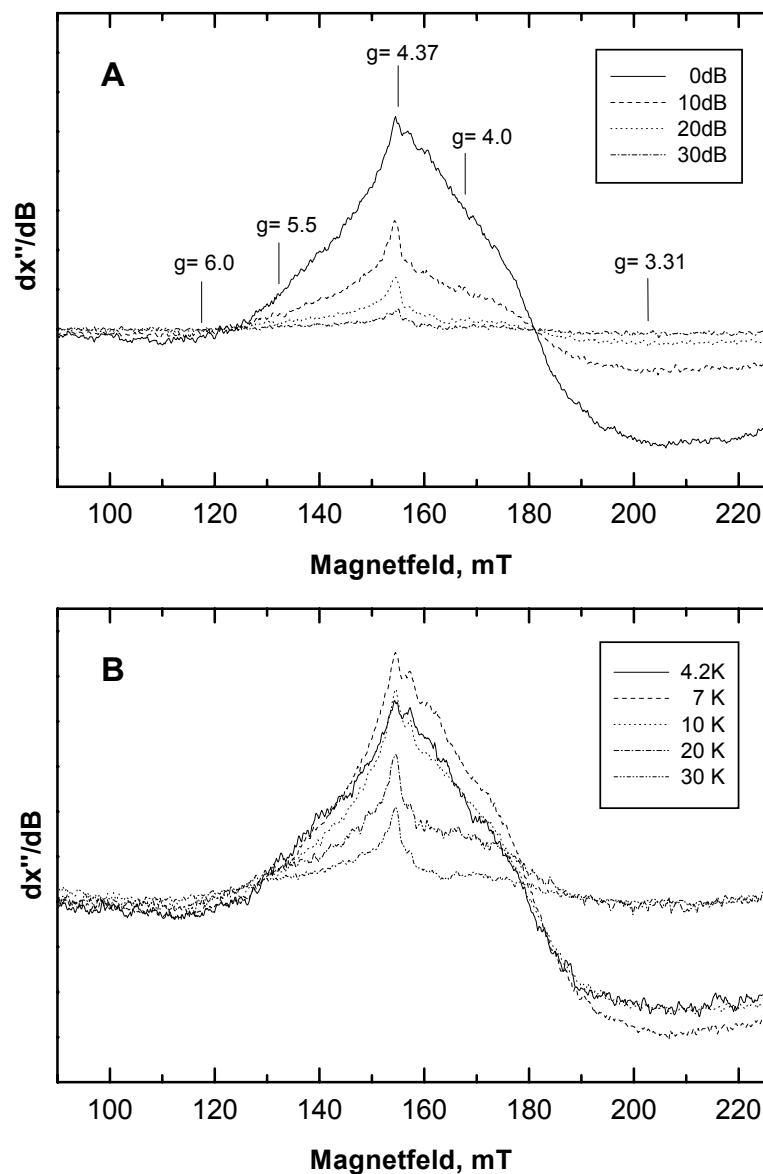
$4S]^{1+}$ -Zentrum das FAD-Semichinon Radikal. Demnach ist das Substrat in der Lage, die Redoxeigenschaften des Enzyms soweit zu modulieren, dass neben der Stabilisierung des FAD-Semichinon die Reduktion der  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentren ermöglicht wird. In Abwesenheit von Substrat erfolgt zunächst die Reduktion des FAD-Benzochinon über das FAD-Semichinon zum FAD-Hydrochinon. Erst danach werden geringe Anteile der  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentren in  $[4Fe-4S]^{1+}$ -Zentren reduziert. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Kofaktoren sich gegenseitig in ihrem Redoxverhalten beeinflussen. In der Tat können die beiden Radikale des EPR-Spektrums in Abbildung 48B nicht voneinander isoliert betrachtet werden. Es handelt sich hierbei nicht um die Addition eines isotropen (FAD-Radikal) und rhombischen ( $[4Fe-4S]^{1+}$ ) EPR-Signals; vielmehr ist das Vorhandensein der zusätzlichen Absorptionslinie bei  $g = 1,967$  sowie bei  $g = 2,1$  mit einer magnetischen Interaktion zweier Radikale erklärbar. Dieser Befund ist im Einklang mit dem zuvor beschriebenen ungewöhnlichen Relaxationsverhalten des FAD-Semichinons der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase. Demnach sind die prosthetischen Gruppen FAD und  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentren sehr nahe zusammen angeordnet ( $< 10 \text{ \AA} - 15 \text{ \AA}$ ).

Eine besonders interessante Beobachtung ist die Reduktion der  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentren der Dehydratase zu  $[4Fe-4S]^{1+}$ -Zentren mit einem Elektronenspin von  $S = 3/2$  in Gegenwart von Crotonyl-CoA (Abbildung 49). Um diese Spektren zu erhalten wurden  $100 \text{ }\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von  $5 \text{ mM}$  Crotonyl-CoA mit ca.  $100 \text{ mM}$  Natriumdithionit für 60 Minuten reduziert. Nur unter diesen massiven Reduktionsbedingungen konnten EPR-Signale mit einem Elektronenspin von  $S = 3/2$  beobachtet werden. Für 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase Präparationen ohne Substrat konnten unter vergleichbaren Bedingungen keine EPR-Signale mit einem Elektronenspin von  $S = 3/2$  detektiert werden (Abbildung 49, durchgezogene Linie). Im  $S = 3/2$  – Grundzustand werden sehr breite absorptionsähnliche Spektren erhalten, bei denen die Signale fast über den gesamten Feldbereich eines X-Band EPR-Spektrometers verteilt sind. Charakteristisch jedoch ist die gut detektierbare breite Absorption bei  $g$ -Werten von 6 bis 3, welche zwei der drei möglichen  $g$ -Werte eines Spin  $3/2$ -Systems beinhalten.



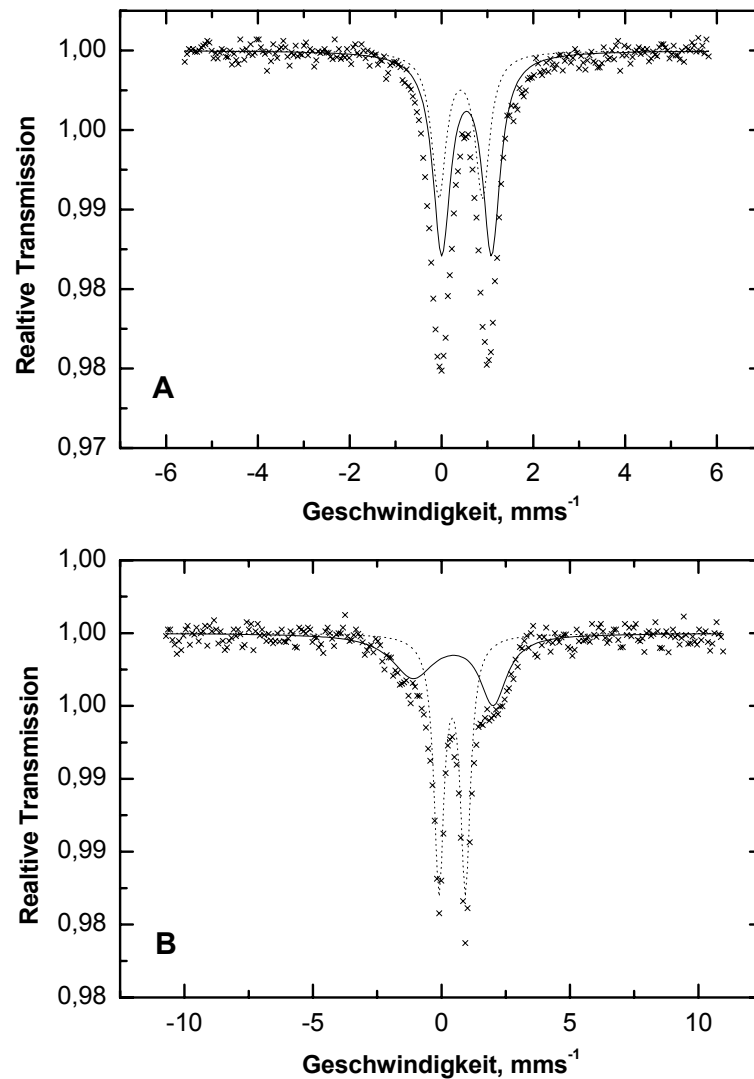
**Abbildung 49: EPR-Spektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit und ohne Crotonyl-CoA nach Reduktion mit Natriumdithionit bei 10K.** Die Proben bestehen jeweils aus 100  $\mu\text{M}$  4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Bicine-Puffer pH 8,5. Natriumdithionit reduziert (durchgezogene Linie) und in Gegenwart von Crotonyl-CoA (5 mM) plus Natriumdithionit (gestrichelte Linie). Die Reduktionsdauer betrug 60 Minuten. EPR-Spektrometer Parameter: Mikrowellenfrequenz 9,45 GHz, Mikrowellenleistung 200 mW, Modulations-Amplitude 1 mT.

Das EPR-Spektrum des Spin  $S = 3/2$  Systems zeigt eine charakteristische Temperaturabhängigkeit<sup>113</sup> (Abbildung 50B). Das Signal kann am besten mit sehr hoher Mikrowellenleistung beobachtet werden und ist kaum abzusättigen (Abbildung 50A), d.h. es werden sehr niedrige Temperaturen und maximale Mikrowellenleistung (ca. 200 mW für X-Band EPR Spektrometer) benötigt, um das Signal gut detektieren zu können. Auch diese Beobachtung spricht für die Existenz eines  $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ -Zentrums mit einem Elektronenspin Grundzustand von  $S = 3/2$ . Demnach kann die intensive Reduktion der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Crotonyl-CoA zu einer Spinumkehr der  $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ -Zentren führen.



**Abbildung 50: EPR-Spektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit Crotonyl-CoA nach Reduktion mit Natriumdithionit bei 10K.** Die Probe besteht aus 100  $\mu$ M 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Bicine-Puffer pH 8,5 plus 5 mM Crotonyl-CoA und 10 mM Natriumdithionit. A, „Powerplot“ bei 4,5 K. B, Temperaturplot bei 200 mW Leistung. Die Modulations-Amplitude betrug immer 1 mT.

Mittels Mössbauer-Spektroskopie wurde versucht weitere Hinweise für eine Substrat induzierte Veränderung der Eisen-Schwefel-Zentren zu gewinnen. Die Zugabe von Substrat zur Dehydratase zeigt keinerlei Veränderungen im Mössbauer-Spektrum der [4Fe-4S]-Zentren, wohingegen eine anschließende intensive Photoreduktion zu signifikanten Veränderungen führt. Die Mössbauer-Spektren bei 4,2 K und 80 K konnten jeweils mit zwei Subspektren simuliert werden (Abbildung 51).



**Abbildung 51. Mössbauer Spekten der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Anwesenheit von Crotonyl-CoA nach Photoreduktion.** Die Enzymkonzentration betrug 350  $\mu\text{M}$ . Temperatur 80 K (Spektrum A, Kreuze) und 4,2 K (Spektrum B, Kreuze). Magnetfeld jeweils 0,2 mT. Spektrum A konnte mit zwei Subspektren simuliert werden. Subspektrum 1 (gestrichelte Linie):  $\delta = 0,42 \text{ mm/s}$ ;  $\Delta E_Q = 0,95 \text{ mm/s}$ ,  $\Gamma = 0,38 \text{ mm/s}$  (37,5% Signal); Subspektrum 2 (durchgezogene Linie):  $\delta = 0,55 \text{ mm/s}$ ;  $\Delta E_Q = 1,09 \text{ mm/s}$ ,  $\Gamma = 0,46 \text{ mm/s}$  (62,5% Signal). Subspektrum 1 entspricht einer Fe-Koordination wie sie in  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren vorkommt, wohingegen das Subspektrum 2 einem tetraedisch koordinierten  $\text{Fe}^{+2,25}$  in  $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ -Zentren zugeordnet werden muss. Spektrum B konnte auch mit zwei Subspektren simuliert werden. Subspektrum 1 (gestrichelte Linie):  $\delta = 0,42 \text{ mm/s}$ ;  $\Delta E_Q = 1,03 \text{ mm/s}$ ,  $\Gamma = 0,47 \text{ mm/s}$  (58% Signal); Subspektrum 2 (durchgezogene Linie):  $\delta = 0,45 \text{ mm/s}$ ;  $\Delta E_Q = 3,13 \text{ mm/s}$ ,  $\Gamma = 1,26 \text{ mm/s}$  (42% Signal). Das Mössbauerspektrum bei 4,2 K ohne externes Magnetfeld zeigt eine ungewöhnliche Verbreiterung!

Die Parameter des ersten Subspektrums entsprechen einer Fe-Koordination wie sie in typischen  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren vorkommt, wohingegen das zweite Subspektrum einem tetraedisch koordinierten  $\text{Fe}^{+2,25}$  in  $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ -Zentren zugeordnet werden muss. Insgesamt konnten 40% der Gesamtfläche als  $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ -Zentren simuliert werden. Demnach konnte in Anwesenheit von Substrat ungefähr die Hälfte der gesamten  $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ -Zentren simuliert werden.



---

$4S]^{2+}$ -Zentren reduziert werden. Dieser Befund entspricht den Beobachtungen aus EPR-spektroskopischen Untersuchungen, wo erst in Anwesenheit von Substrat größere Mengen (40% - 80%) der Kubane reduziert wurden. Substratbindung führte demnach zu signifikanten Veränderungen in der Dehydratase, die wahrscheinlich das Redoxpotential der  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentren herabsetzen.

Das Mössbauerspektrum bei 4,2 K, welches ohne ein externes Magnetfeld aufgenommen wurde, zeigt eine ungewöhnliche Verbreiterung (Abbildung 51B). Dieses Phänomen kann mit einer magnetischen Kopplung erklärt werden. Weitere Untersuchungen mittels Mössbauer-Spektroskopie bei extern angelegten Magnetfeld sind notwendig, um den Elektronenspinzustand der  $[4Fe-4S]^{1+}$ -Zentren bestimmen zu können.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Struktur und Zusammensetzung der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ein Homotetramer ( $\alpha = 54,5$  kDa) bildet und aus 2 FAD, 8-16 Nicht-Häm Eisen und 8-16 säurelabilen Schwefel zusammengesetzt ist<sup>11,97</sup>. Diese stark variierenden Werte für den Eisen-Gehalt erlaubten keine zufriedenstellende Bewertung der EPR- und Mössbauerspektroskopischen Untersuchungen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nur eine strikt anaerobe und besonders schonende Reinigungsprozedur zur Isolierung des nativen Enzymsystems führt. Sehr aktive Präparation wurden nur dann erhalten, wenn die Chromatographie-Materialien vor dem Einsatz für längere Zeit (ca. 12-24 h) in Puffern mit Reduktionsmitteln gelagert wurden. In diesen Präparationen wurden maximal 16 Fe und 4 FAD pro Homotetramer ermittelt. Demnach sind pro Untereinheit der nativen Dehydratase ein FAD und ein [4Fe-4S]-Zentrum vorhanden. Aufgrund der hohen Instabilität dieses Enzymsystems ist es ratsam, möglichst jede Präparation auf ihren Gehalt an Kofaktoren zu überprüfen. Der Verlust der Eisen-Schwefel-Zentren als auch des FAD wird durch Sauerstoff-Exposition des Enzyms verursacht. Die Inaktivierung der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit Sauerstoff führt zur Zerstörung der [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentren und im Zusammenhang dazu auch zu einem FAD-Verlust. Der Zerstörungsmechanismus der [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase war bislang unklar, da im EPR die Bildung von [3Fe-4S]<sup>1+</sup>-Zentren als auch [2Fe-2S]<sup>1+</sup>-Zentren nicht nachgewiesen werden konnte<sup>98</sup>. Mössbauer-spektroskopische Untersuchungen von Ute Müh und Eckhard Bill zeigten die Bildung eines neuen Eisen-Schwefel-Zentrums nach Sauerstoff-Inaktivierung<sup>98</sup>. Die Daten wurden mit zwei magnetisch interagierenden [3Fe-4S]<sup>1+</sup>-Zentren erklärt. Jedoch wurde solch ein Phänomen bisher für kein anderes Protein im Zusammenhang mit einer Sauerstoff-Inaktivierung beschrieben. Es konnten keine [3Fe-4S]<sup>1+</sup>-Zentren mittels EPR-Spektroskopie identifiziert werden. Die Befunde aus dieser Arbeit sprechen für die Bildung von zweikernigen Eisen-Schwefel-Zentren. Dies konnte mittels UV-Vis- und Mössbauer-Spektroskopie eindeutig nachgewiesen werden. Im EPR wurden nur minimale Mengen ( $< 1\%$ ) an [3Fe-4S]<sup>1+</sup>-Zentren gefunden. Der Zerfall von [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentren in [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Zentren wurde auch für das Nitrogenase Fe-Protein aus *Azotobacter vinelandii*<sup>142</sup>, das FNR-Protein<sup>49</sup> oder die Biotin-Synthase aus *E. coli*<sup>143</sup> beschrieben. Für den Transkriptionsfaktor FNR konnte gezeigt werden, dass die Cluster-Umwandlung des aktiven Dimers mit [4Fe-4S]-Zentren zu einem inaktiven Monomer mit [2Fe-2S]-Zentren führt. Unter anaeroben Bedingungen erfolgt eine

erneute Dimerisierung und der Aufbau der [4Fe-4S]-Zentren, so dass der anaerobe Stoffwechsel von *E. coli* aktiviert werden kann. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass auch der Aktivator der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *Acidaminococcus fermentans* eine [4Fe-4S]/[2Fe-2S]-Umwandlung erfahren kann<sup>144</sup>. Die interessante Struktur von diesem Aktivator-Protein weist ein [4Fe-4S]-Zentrum auf, das von zwei Untereinheiten aufgespannt wird<sup>145</sup>. Das Phänomen der Cluster-Umwandlung wird vorwiegend bei solchen Enzymen beobachtet, deren [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentren im Zwischenraum von zwei Untereinheiten lokalisiert. Proteine mit [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentren, die im inneren einer Untereinheit lokalisiert sind, zeigen bei Inaktivierung oftmals eine stabile [3Fe-4S]<sup>1+</sup>-Bildung<sup>22</sup>. Die Bildung von [3Fe-4S]<sup>1+</sup>-Zentren aus [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentren kann z.T. auch mittels starker Chelatisierungsmittel wie z.B.  $\alpha,\alpha'$ -Bipyridyl oder Bathophenanthrolin-Disulfonat erzielt werden. Dies konnte für das Aktivator-Protein als auch für die Aconitase aus Schweineherz gezeigt werden<sup>47,144</sup>. Während die Chelator-Behandlung beim Aktivator-Protein zur Bildung eines [2Fe-2S]-Zentrums führt, konnte in der Aconitase ein [3Fe-4S]-Zentrum gebildet werden. Die Bildung eines [3Fe-4S]-Zentrums in der Aconitase stellt eine Besonderheit dar, da ein Eisen des [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrums nicht über ein Cystein des Proteins koordiniert ist. Die Koordination des sogenannten „labilen Eisens“  $F_a$ , wird über ein Hydroxylion gewährleistet, welches während der Katalyse protoniert wird<sup>44,146</sup>. Gleichzeitig bindet  $F_a$  zwei Sauerstoffatome des Citrat. Durch die Zugabe von Reduktionsmitteln und Fe(II) kann das [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum der Aconitase rekonstituiert werden. Die Bildung von [2Fe-2S]-Zentren in der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase gibt einen Hinweis auf die Lokalisation der [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentren. Diese könnten im Zwischenraum der Untereinheiten angeordnet sein. Das könnte die große Instabilität des Proteins und den damit einhergehenden Verlust der Kofaktoren erklären. Interessanterweise wurden in der Gensequenz der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase zwar 14 Cysteinreste identifiziert, die für die Koordination des [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrums in Frage kommen könnten. Das gefundene Sequenzmotiv  $CX_3CX_{195}C$  unterscheidet sich von den gewöhnlichen Sequenzmotiven  $CX_2C$  oder  $CX_2CX_2C$  für [4Fe-4S]-Zentren<sup>41,92</sup>. Für die Aconitase zum Beispiel wurde das Sequenzmotiv  $CX_{75}CX_2C$  beschrieben. Diese Befunde unterstützen die Annahme, dass die [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase sich von gewöhnlichen Kubanen als auch von den [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentren der Aconitase unterscheiden. Aufgrund der ungewöhnlichen EPR-Relaxationseigenschaften des FAD-Semichinons konnten Hinweise für die Lokalisation beider prosthetischen Gruppen gefunden werden. In EPR-Versuchen konnte für das FAD-Semichinon der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase eine sehr starke temperaturabhängige Relaxation

beobachtet werden. Als Vergleich wurden die Relaxationseigenschaften der Flavinradikale der Flavoproteine Flavodoxin und Cholesterol-Oxidase bestimmt, welche keine Auffälligkeiten zeigten und sich wie typische Flavoproteine verhielten<sup>147</sup>. Die Relaxation des FAD-Semichinons der Dehydratase dagegen nimmt bei Temperaturen > 40 Kelvin stark zu. Solche Relaxationseffekte können insbesondere durch die Anwesenheit von reduzierten Eisen-Schwefel-Zentren ( $S = \frac{1}{2}$ ) verursacht werden<sup>148</sup>. Die Eisen-Schwefel-Zentren der untersuchten Dehydrataseprobe waren jedoch nicht reduziert und sind mit einem Elektronspin,  $S = 0$  EPR inaktiv. Da aber Eisen-Schwefel-Zentren antiferromagnetisch-gekoppelte Systeme sind, können sie Spinzustände >0 annehmen. Diese höheren Spinzustände werden bei Erhöhung der Temperatur eingenommen. In diesem Fall ist der Spin geradzahlig und damit EPR inaktiv, jedoch sind sie in der Lage andere Paramagneten zu relaxieren. Mittels NMR an Ferredoxinen wurden Hinweise für den Einfluß dieser höheren Spinzustände gefunden, die zu den sogenannten „contact shifts“ benachbarter Protonen führen<sup>149,150</sup>. Demnach sind die beiden prosthetischen Gruppen FAD und  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Cluster sehr dicht beieinander angeordnet. Der Abstand dürfte nicht mehr als 10 - 15 Å betragen, damit die hier beschriebenen Relaxationsphänomene stattfinden können. Aufgrund der Nähe ist ein Elektronentransfer zwischen beiden Kofaktoren möglich und könnte im Reaktionsmechanismus eine Rolle spielen.

## **5.2 Modulation der thermodynamischen Eigenschaften des FAD und der $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratase nach Substrat-Bindung**

Die Modulation der thermodynamischen Eigenschaften von Redoxzentren aufgrund einer Substratbindung wurde schon bei einigen Elektronentransferierenden Proteinen beobachtet. Insbesondere der Einfluss einer ATP-Bindung auf die Eisen-Schwefel-Zentren des Fe-Proteins der Nitrogenase als auch des Aktivators der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase wurden in letzter Zeit eingehend untersucht und deren Rolle für den Katalysemechanismus diskutiert. Beide Proteine erfüllen in ähnlicher Weise einen Aktivierungsschritt welcher zuvor eine Bindung von ATP erfordert. Anschliessend kann die ATP-gebundene Form zur Reduktion des jeweiligen Enzymkomplexes dienen, dem Nitrogenase- oder Dehydratasesystem. Es konnte gezeigt werden, dass die ATP-Bindung zu einer Konformationsveränderung führt, die wahrscheinlich die Redox Eigenschaften des  $[4Fe-4S]$ -Zentrums verändert. Nur die ATP-gebundene Form beider Aktivatoren erlaubt die Reduktion des jeweiligen Enzymsystems. In dieser Arbeit konnten mehrere Hinweise für die Modulation der

Redoxpotentiale der Kofaktoren der 4-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratase nach Substratbindung gefunden werden. Zunächst wurde die Redoxchemie des FAD und der  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase eingehend untersucht. Es wurden Redoxpotentiale für beide Kofaktoren in An- und Abwesenheit von Substrat ermittelt. Das Redoxpotential für den  $\text{FAD}_{\text{bq/sq}}$ -Übergang wurde mit  $-93 \text{ mV}$  ( $\pm 6 \text{ mV}$ ) und für den  $\text{FAD}_{\text{sq/hq}}$ -Übergang mit  $-298 \text{ mV}$  ( $\pm 6 \text{ mV}$ ) in EPR verfolgten Redoxtitrationen bestimmt. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte unterscheiden sich von den zuvor mittels UV-Vis-Spektroskopie erhaltenen Resultaten<sup>97</sup>,  $\text{FAD}_{\text{bq/sq}} = -140 \text{ mV}$  und  $\text{FAD}_{\text{sq/hq}} = -240 \text{ mV}$ . Aufgrund der Beobachtung, dass nur aktive 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in der Lage ist, das FAD-Semichinon zu stabilisieren, sind die mit EPR-Spektroskopie erhaltenen Redoxtitrationsdaten repräsentativ für das aktive Enzym, wohingegen die UV-Vis verfolgten Redoxtitrationen freies FAD als auch FAD, welches nicht mehr in der Lage ist vom Protein zum Semichinon stabilisiert zu werden, erfassen. Obwohl diese Redoxpotentiale typisch für Flavoproteine sind<sup>75</sup>, ist der Befund, dass beide Elektronenübergänge mit einer Potentialdifferenz von ca. 200 mV auseinanderliegen, interessant. Die große Trennung beider Elektronenübergänge führt zu einer begünstigten thermodynamischen Stabilisierung der FAD-Semichinonstufe. Daher können in der 4-Hydroxybutyryl-CoA Dehydratase große Mengen an FAD-Semichinon detektiert werden. Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in der FAD-Benzochinonstufe aktiv ist und durch Reduktion reversibel inaktiviert werden kann<sup>11</sup>. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass auch die FAD-Semichinonstufe der Dehydratase keine aktive Form des Enzyms darstellt.

Es war bekannt, dass die Reduktion der  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren zu  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentren äußerst schwierig ist und durch langwierige Photoreduktion mit 5-Deazaflavin annähernd nur 20% der gesamten Cluster reduziert werden können<sup>97</sup>. In elektrochemischen Versuchen mittels Cyclovoltammetrie konnte dieser Befund bestätigt werden. Obwohl die Dehydratase mit einem Reduktionspotential von maximal  $-1,5 \text{ V}$  reduziert wurde, erfolgte die Reduktion der  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren sehr langsam. Demnach ist nicht allein das Redoxpotential der  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren für die schlechte Reduzierbarkeit verantwortlich, sondern auch die sehr langsame Reduktionskinetik. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass die  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren sehr gut von dem Lösungsmittel abgeschirmt sind und womöglich die Reduktion mit einer Konformationsänderung des Proteins einhergeht. Im Gegensatz dazu erfolgte die Oxidation der  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentren zu  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren an der Elektrode in nur wenigen Sekunden, wohingegen die Reduktion mehrere Minuten dauerte. Auch diese

Beobachtung spricht für eine Konformationsänderung der Dehydratase, die durch den Wechsel des Redoxzustandes ermöglicht wird. Auch das Redoxverhalten des FAD Kofaktors ist ungewöhnlich, da in Redox titrationen als auch in früheren Beobachtungen<sup>11</sup> die Reoxidation der FAD-Hydrochinonstufe als auch FAD-Semichinonstufe der Dehydratase mit dem herkömmlichen Oxidationsmittel Kaliumhexacyanoferrat nur sehr langsam verläuft. Mit Dichlorophenolindophenol oder Thionin konnten schnellere Oxidationen erreicht werden, obwohl das Oxidationspotential von Kaliumhexacyanoferrat um ca. 200 mV positiver ist. Da Kaliumhexacyanoferrat ein Anion ist, könnte aufgrund der Ladungsverhältnisse eine kinetische Barriere vorhanden sein, die keine schnelle Oxidation erlaubt. Jedoch wurde auch in einer elektrochemischen Redox titration eine ungewöhnlich langsame Oxidation des FAD-Hydrochinons und besonders des FAD-Semichinons beobachtet. Es hat sich gezeigt, dass die FAD-Semichinonstufe der Dehydratase nur sehr schwer zu oxidieren ist, wohingegen die Bildung sehr leicht erfolgt. Diese Befunde sind weitere Hinweise dafür, dass die Reduktion der Dehydratase sehr wahrscheinlich zu einer Konformationsveränderung des Enzyms führen. Da bekanntlich die Dehydratase nur im FAD-Benzochinon aktiv ist, könnte die Veränderung des Oxidationszustandes des FAD für eine regulatorische Funktion der Enzymaktivität und damit auch für den gesamten Stoffwechsel genutzt werden.

Mittels Cyclovoltammetrie wurde das Redoxpotential für den  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Übergang mit  $< -600$  mV abgeschätzt. Interessanterweise führt die Anwesenheit von Substrat zu starken Veränderungen der Redoxeigenschaften beider prosthetischen Gruppen. Für den  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Übergang konnte in Gegenwart von Crotonyl-CoA ein Redoxpotential von  $-414$  mV bestimmt werden. Dieses Reduktionspotential kann leicht mit Natriumdithionit bei pH 9,0 erzeugt werden und erklärt die leichte Reduzierbarkeit der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Substrat. Dadurch war es möglich die  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren quantitativ zu reduzieren. Durch eine langandauernde Reduktion mit Natriumdithionit in Gegenwart von Substrat konnten erstmals  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentren mit einem Elektronenspin von  $S = 3/2$  beobachtet werden, wohingegen ohne Substrat ein Elektronenspin von  $S = 1/2$  detektiert wurde. Aufgrund dieser Beobachtung ist es sehr wahrscheinlich, dass die Dehydratase in Gegenwart von Substrat eine Konformationsänderung erfährt.

Die signifikante Erhöhung des Redoxpotentials in einen physiologischen Bereich könnte dazu dienen, dass in Gegenwart von Substrat Elektronentransferprozesse möglich werden. Ursprünglich wurde angenommen, dass aufgrund des sehr niedrigen Redoxpotentials für den  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Übergang Elektronentransferprozesse

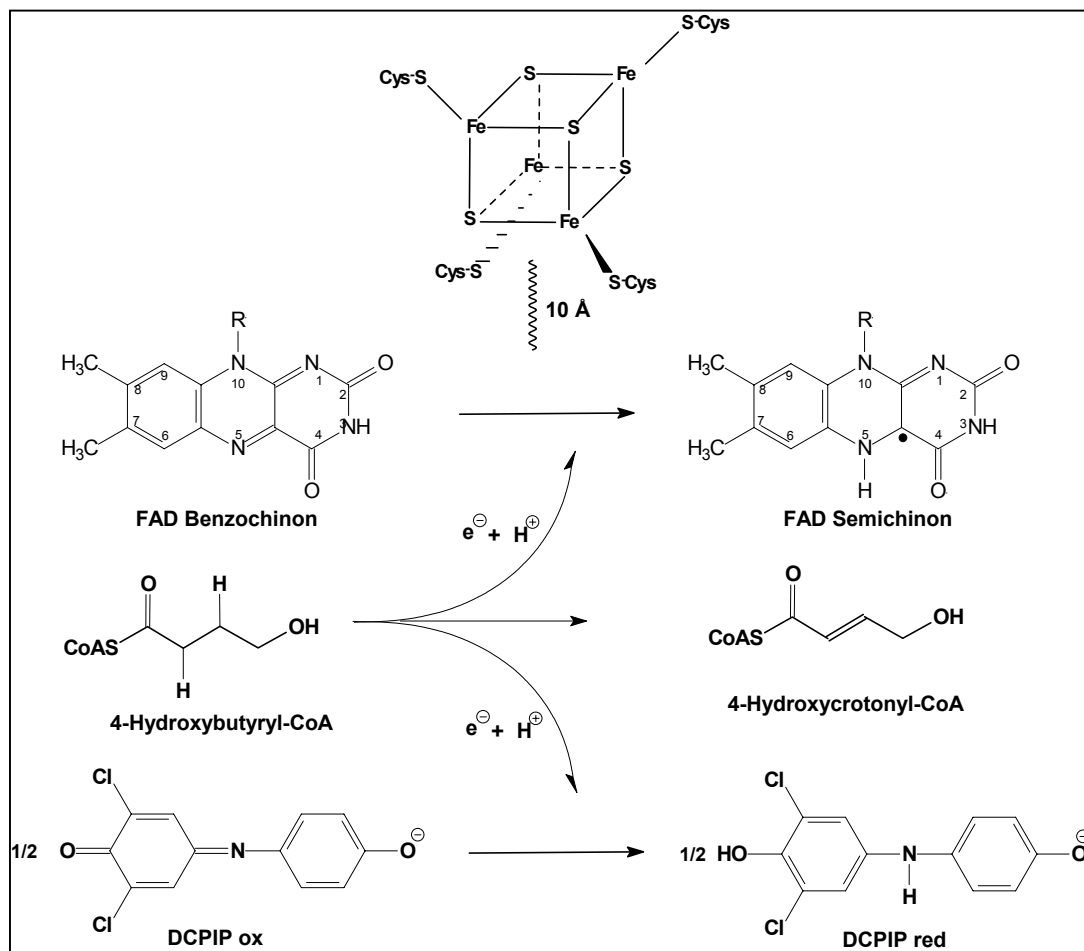
ausgeschlossen und stattdessen eine strukturelle Funktion den Eisen-Schwefel-Zentren zugeschrieben wurde<sup>97</sup>. Auch für das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum der gut untersuchten Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase aus *Bacillus subtilis* wurde ein Redoxpotential von  $< -600$  mV angenommen, da mit herkömmlichen Methoden es nicht möglich war, das Redoxpotential des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Übergangs zu bestimmen<sup>58</sup>. Für das Eisen-Schwefel-Zentrum der Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase wurde eine strukturelle Funktion zugeschrieben<sup>60,152</sup>. Aufgrund der hier erzielten Ergebnisse sind in der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase Elektronentransferprozesse mittels der Eisen-Schwefel-Zentren sehr wahrscheinlich.

Auch das Redoxpotential des  $\text{FAD}_{\text{hq/sq}}$ -Übergangs wurde nach Bindung von Crotonyl-CoA ( $K_d = 57 \mu\text{M}$ ) bis zu 200 mV erhöht. CoASH, das viel schlechter bindet ( $K_d = 1,0 \text{ mM}$ ) erhöht das Redoxpotential immerhin noch um 100 mV. Die Erhöhung von Flavin Redoxpotentialen nach Substratbindung wurde auch für die Succinat-Dehydrogenase<sup>153,154</sup> und Glutamat-Synthase<sup>155</sup> beschrieben. In der Regel führt die Modulation der Redoxpotentiale zu einer erleichterten Reduktion bzw. Oxidation des Enzyms, je nachdem welcher Redoxzyklus für die Katalyse benötigt wird. Die Veränderung der Redoxpotentiale für Flavine als auch Eisen-Schwefel-Zentren wird durch Konformationsänderungen des Proteins verursacht. Hierbei spielen die Zugänglichkeit verschieden Aminosäurereste und die Exposition zum Lösungsmittel eine wichtige Rolle<sup>22,35,156-158</sup>. Jedoch gibt es keine umfassende Theorie, die die große Variation der Redoxpotentiale in den verschiedensten Eisen-Schwefel- und Flavoproteinen beschreibt. In  $^1\text{H}$ -ENDOR Untersuchungen des FAD-Semichinons der Dehydratase konnte gezeigt werden, dass die Substratbindung zu einer Verschiebung der Elektronendichte auf dem Flavinring in Richtung der C8 Methylgruppe führt. Der Vergleich mit den bekannten Strukturen der Eisen-Schwefel-Flavoenzyme Trimethylamin-Dehydrogenase (Kofaktoren: FMN und  $[4\text{Fe-4S}]$ Cluster) und Phthalat-Dioxygenase-Reduktase (Kofaktoren: FAD und  $[2\text{Fe-2S}]$ Cluster) zeigt, dass bei diesen Proteinen das Eisen-Schwefel-Zentrum in direkter Nachbarschaft zur C8-Methylgruppe des Flavinringes lokalisiert ist<sup>160,161</sup>. Für die Ferredoxin-NADP-Reduktase wurde eine ähnliche Anordnung mit dem Substrat Ferredoxin und dem Flavinkofaktor als sehr wahrscheinlich angenommen<sup>162</sup>. Demnach könnte die C8-Methylgruppe des FAD der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase als „Brücke“ zu dem  $[4\text{Fe-4S}]$ Cluster dienen und eine Kopplung beider Kofaktoren ermöglichen. In der Tat konnten in EPR-Versuchen mit Natriumdithionit-reduzierter Dehydratase in Anwesenheit von Substrat zusätzliche Resonanzlinien detektiert werden, die für eine Kopplung beider Kofaktoren sprechen. Obwohl diese Ergebnisse mit der Dehydratase in ihrer inaktiven Semichinonform

erhalten wurde, können die beobachteten Veränderungen der Elektronendichte des Flavins als ein strukturelles Model für die Substratbindung an das aktive Enzym interpretiert werden. Aufgrund dieser Substrat induzierten Erhöhung der Redoxpotentiale des FAD und der [4Fe-4S]-Zentren bis zu +200 mV ist die Beteiligung beider Kofaktoren an Elektronentransferschritten in der Katalyse sehr wahrscheinlich.

In diesem Zusammenhang ist auch die ungewöhnliche Substrat-induzierte FAD-Semichinon Bildung der Dehydratase in Anwesenheit von Dichlorophenolindophenol zu sehen. Obwohl DCPIP ein Redoxpotential von +219 mV besitzt, wurden nach Zugabe von Crotonyl-CoA maximale Ausbeuten an FAD-Semichinon in der Dehydratase detektiert. Der große Überschuss an DCPIP und das Potential von +219 mV hätten eigentlich zu einer völligen Oxidation des FAD-Semichinon zum FAD-Benzochinon führen müssen, stattdessen konnten maximale Mengen an FAD-Semichinon stabilisiert werden. Dieses Resultat entspricht den Beobachtungen aus den elektrochemischen Versuchen, wo in Gegenwart von Substrat der  $\text{FAD}_{\text{sq/bq}}$ -Übergang nicht mehr an der Elektrode detektiert werden konnte, obwohl Potentiale von bis zu +500 mV angelegt wurden. Stattdessen erfolgte ein kontinuierlicher Stromfluß zur Elektrode, der durch die sukzessive Oxidation des FAD-Semichinons der Dehydratase erklärt werden kann. Diese Beobachtung ist nur dadurch zu erklären, dass die Dehydratase auf der Stufe des FAD-Semichinons von der Elektrode oxidiert wurde. Da es sich um einen kontinuierlichen Stromfluss handelte, der in Anwesenheit von einem großen Überschuß an Substrat mehrere Minuten dauerte, muss angenommen werden, dass durch die Substrat-induzierte FAD-Semichinon-Bildung der Nachschub an Elektronen ermöglicht wurde. Jedoch kann es sich hierbei nicht um eine Dehydratisierung handeln, vielmehr sind die Daten mit einer Dehydrogenase-Aktivität zu erklären. In diesem Fall könnte sich 4-Hydroxycrotonyl-CoA gebildet haben. In Abbildung 52 ist ein hypothetischer Mechanismus der Substrat-induzierten oxidativen FAD-Semichinon-Bildung mit der Bildung von 4-Hydroxycrotonyl-CoA gezeigt. Weitergehende Untersuchungen zur Isolierung und Identifizierung des postulierten Intermediates 4-Hydroxycrotonyl-CoA könnten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Reaktionsmechanismus liefern.





**Abbildung 52: Hypothetischer Mechanismus der 4-Hydroxycrotonyl-CoA Bildung.** In diesem Modell ist eine Untereinheit der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase gezeigt. Die Substratzugabe in Gegenwart von DCPIP führt zur Bildung eines stabilen persistierenden FAD-Semichinons. Die zwei-Elektronen Oxidation des 4-Hydroxybutyryl-CoA führt zur Bildung von 4-Hydroxycrotonyl-CoA und zur Reduktion des DCPIP. Das FAD-Semichinon ist resistent gegenüber einer Oxidation zum Benzochinon! Der Verlust von Reduktionsequivalenten führt zur Ausschleusung von 4-Hydroxycrotonyl-CoA.

### 5.3 Identifizierung radikalischer Intermediate nach Substrat Zugabe

Die Zugabe von Substrat zu oxidiert vorliegender 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase führt zur Detektion eines FAD-Semichinons. Die Spinquantifizierung ergab, dass je nach Präparation 10-15% Semichinon gebildet worden ist. Dieser Befund stützt die Annahme, dass die ungewöhnliche Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA über einen Radikalmechanismus ablaufen könnte. In dem postulierten Ketyl-Mechanismus wird die Bildung eines FAD-Semichinon Radikals gefordert. Einhergehend mit der Bildung eines Flavin Radikals müsste sich ein Substratradikal bilden. In EPR-Versuchen wurde nach Substratzugabe bei tiefen Temperaturen ( $< 40\text{ K}$ ) neben dem FAD-Semichinon Radikal ein komplexes EPR-Spektrum detektiert, welches aus weiteren Radikalen zusammengesetzt ist und zu 5% des gesamten Proteins zugeordnet werden konnte. Das EPR-Spektrum wurde zu zwei axialen EPR-Signalen zugeordnet, mit jeweils zwei  $g$ -Werten über bzw. unter 2,00. Die Charakteristika aus den EPR-Versuchen sind am besten mit der Existenz von reduzierten  $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentren zu erklären, obwohl diese  $g$ -Werte nicht mit den bekannten  $g$ -Werten für bisher beschriebene gewöhnliche Eisen-Schwefel-Zentren in Übereinstimmung sind. Zudem ist das EPR-Spektrum im Vergleich zu dem mit Natriumdithionit erzeugten  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentrum ganz anders. Für die Lactyl-CoA-Dehydratase wurde ein ähnliches axiales EPR-Signal mit  $g_z = 2,0232$  und  $g_{xy} = 2.0006$  beschrieben, welches einem reduzierten  $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentrum zugeordnet wurde, obwohl die Autoren feststellen mussten, dass für kein anderes Eisen-Schwefel-Zentrum solch ein Spektrum beschrieben wurde<sup>163</sup>. Auch dieses Enzym katalysiert eine Dehydratisierung die eine Deprotonierung eines nicht-aziden Protons erfordert. Die Komplexität des EPR-Spektrums der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase lässt vermuten, dass hier auch eine Kopplung zweier Radikale vorliegen könnte<sup>159</sup>. Die magnetische Kopplung könnte mit dem FAD-Semichinon erfolgen, welches in dieser Probe existent ist und zumal Hinweise für eine Nachbarschaft innerhalb von 10-15 Å gefunden wurden. Die EPR-Versuche belegen eindeutig die Substrat abhängige Bildung dieser Radikale, jedoch muss eine weitergehende Analyse zur Charakterisierung erfolgen. Vermutlich könnte es sich hierbei um das postulierte Ketyl-Radikal handeln. Für die bekannten Enzyme Ribonukleotid-Reduktase aus *E. coli* als auch für die Benzoyl-CoA-Reduktase aus *Thauera aromatica* wurden Reaktionsmechanismen postuliert, in denen die Bildung von Ketyl-Radikalen postuliert wird. Bislang konnte jedoch für keines dieser Enzymsysteme ein Ketyl-Radikal nachgewiesen werden. Die Existenz eines solchen Ketyl-Radikals bleibt vorläufig eine Spekulation.

#### 5.4 Die Funktion von FAD und [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentren in einem hypothetischen Reaktionsmechanismus

In Anwesenheit von Substrat wird mit Reduktionsmitteln wie Natriumdithionit nur das FAD über das Semichinon zum Hydrochinon reduziert. Substratzugabe zum oxidiert vorliegenden Enzym führt dagegen zur Bildung des Flavin-Semichinons ohne Reduktionsmittel. Außerdem wurden bei 10 K EPR-Banden detektiert, die zum Teil einem reduzierten [4Fe-4S]<sup>1+</sup>-Cluster zugeordnet werden können und/oder ein neuartiges Radikal X<sup>\*</sup> anzeigen (siehe unten). Das Flavin-Semichinon, das im UV-Vis bei 540 nm sichtbar ist, entsteht bei Substratzugabe mit einer Geschwindigkeit von 400 s<sup>-1</sup>. Zudem konnte eine zweite Reaktion detektiert werden, die deutlich langsamer war. Mit 4-Hydroxybutyryl-CoA als Substrat wurde für diese Reaktion eine Reaktionsgeschwindigkeit von 12 s<sup>-1</sup> bestimmt, wohingegen mit Crotonyl-CoA diese Reaktion mit 4 s<sup>-1</sup> detektiert wurde. Dieser Befund ist im Einklang mit der Gleichgewichtskonstante für die Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA, die mit 4:1 auf der Seite des Crotonyl-CoA liegt<sup>11</sup>. Die Verwendung von regiospezifisch deuterierten Substraten am  $\alpha$ -C-Atom sowie am  $\beta$ -C-Atom in Stopped-flow Versuchen hat gezeigt, dass die zweite Reaktion mit diesen Substraten signifikant langsamer verläuft. Für 4-Hydroxy[2-<sup>2</sup>H]butyryl-CoA wurde bei verschiedenen Wellenlängen ein primärer Deuterium Isotopeneffekt von ca. 4 - 6 ermittelt, wohingegen die Verwendung von 4-Hydroxy[2-<sup>3</sup>H]butyryl-CoA zu einem Isotopeneffekt von 2 - 3 führte. Dieser Isotopeneffekt deutet darauf hin, dass die eigentliche Dehydratisierung der langsamen Reaktion zuzuordnen ist. Außerdem entspricht die Geschwindigkeit der langsamen Reaktion dem Turnover des Enzyms. Damit muss der in der Einleitung postulierte Mechanismus modifiziert werden, da das Flavinradikal ca. 30 mal schneller als die H-Abstraktion gebildet wird. Vielleicht induziert die Substratbindung eine Oxidation einer Aminosäureseitengruppe z.B. Tyrosin (vergleiche Ribonukleotidreduktase) zu einem Radikal unter Reduktion des FAD zum Semichinon. Dieses Radikal X<sup>\*</sup>, das im EPR-Spektrum vorhanden sein könnte (Abbildung 39), abstrahiert das  $\alpha$ -H-Atom des 4-Hydroxybutyryl-CoA unter Bildung des Enoxyradikals, das nun zum Dienoxyradikal dehydratisiert werden kann. Letzteres holt sich das H-Atom unter Crotonyl-CoA-Bildung zurück. In diesem Fall wäre das FAD an dem direkten Elektronenzyklus mit dem Substrat nicht beteiligt und könnte vielmehr „überschüssige“ Elektronen vorübergehend aufnehmen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., and Farrow, J. A. E. (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven species combinations *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 812-826
2. Buckel, W., and Barker, H. A. (1974) Two pathways of glutamate fermentation by anaerobic bacteria *J. Bacteriol.* 117(3), 1248-1260
3. Herdegen, T. (1997) *Neurobiologische Grundlagen, Klinische Neurobiologie* (Herdegen, T., Tölle, T. R., and Bähr, M., Eds.), Spektrum Akad Verl, Heidelberg, Berlin, Oxford
4. Dorner, C., and Schink, B. (1990) *Clostridium homopropionicum* sp. nov., a new strict anaerobe growing with 2-, 3-, or 4-hydroxybutyrate *Arch Microbiol* 154(4), 342-8
5. Meckenstock, R. U., Krieger, R., Ensign, S., Kroneck, P. M., and Schink, B. (1999) Acetylene hydratase of *Pelobacter acetylenicus*. Molecular and spectroscopic properties of the tungsten iron-sulfur enzyme *Eur J Biochem* 264(1), 176-82
6. Matthies, C., Evers, S., Ludwig, W., and Schink, B. (2000) *Anaerovorax odorimutans* gen. nov., sp. nov., a putrescine-fermenting, strictly anaerobic bacterium *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 4, 1591-4
7. Hardman, J. K., and Stadtman, T. C. (1960) Metabolism of omega-amino acids. I. Fermentation of gamma-aminobutyric acid by *Clostridium aminobutyricum* *J Bacteriol* 79, 544-548
8. Hardman, J. K., and Stadtman, T. C. (1963) Metabolism of omega-amino acids. III. Mechanism of conversion of gamma-hydroxybutyrate by *Clostridium aminobutyricum* *J Biol Chem* 238, 2081-2087
9. Hardman, H. K., and Stadtman, T. C. (1963) Metabolism of gamma-amino acids. IV. gamma-Aminobutyrate fermentation by cell-free extracts of *Clostridium aminobutyricum* *J Biol Chem* 238, 2088-2093
10. Willadsen, P., and Buckel, W. (1990) Assay of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase from *Clostridium aminobutyricum* *FEMS Microbiol Lett* 58(2), 187-91
11. Scherf, U., and Buckel, W. (1993) Purification and properties of an iron-sulfur and FAD-containing 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase/vinylacetyl-CoA delta

- 3-delta 2- isomerase from *Clostridium aminobutyricum* *Eur J Biochem* 215(2), 421-9
12. Buckel, W. (2001) Unusual enzymes involved in five pathways of glutamate fermentation *Appl Microbiol Biotechnol* 57(3), 263-73
  13. Hans, M. (1996) Untersuchungen zum Katalysemechanismus der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium symbiosum* und *Acidaminococcus fermentans*. Diplomarbeit Marburg
  14. Hans, M., Sievers, J., Müller, U., Bill, E., Vorholt, J. A., Linder, D., and Buckel, W. (1999) 2-Hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Clostridium symbiosum* *Eur. J. Biochem.* 265(1), 404-414
  15. Dickert, S., Pierik, A. J., Linder, D., and Buckel, W. (2000) The involvement of coenzyme A esters in the dehydration of (R)-phenyllactate to (E)-cinnamate by *Clostridium sporogenes* *Eur J Biochem* 267(12), 3874-3884
  16. Hofmeister, A. E., Berger, S., and Buckel, W. (1992) The iron-sulfur-cluster-containing L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*. Stereochemistry of the deamination of L-threonine *Eur J Biochem* 205(2), 743-9
  17. Kuchta, R. D., and Abeles, R. H. (1985) Lactate reduction in *Clostridium propionicum*. Purification and properties of lactyl-CoA dehydratase *J. Biol. Chem.* 260(24), 13181-13189
  18. Buckel, W., and Keese, R. (1995) One electron redox reactions of CoASH esters in anaerobic bacteria *Angew Chem Int Ed Engl* 107, 1595-1598
  19. Buckel, W. (1996) Unusual dehydrations in anaerobic bacteria: considering ketyls (radical anions) as reactive intermediates in enzymatic reactions *FEBS Lett.* 389(1), 20-24
  20. Wachtershauser, G. (1988) Before enzymes and templates: theory of surface metabolism *Microbiol Rev* 52(4), 452-84
  21. Wachtershauser, G. (1992) Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world *Prog Biophys Mol Biol* 58(2), 85-201
  22. Cammack, R., and Sykes, A. G. (1999) *Advances In Inorganic Chemistry: Iron Sulfur Proteins*, 47
  23. Beinert, H., and Palmer, G. (1965) Contributions of EPR spectroscopy to our knowledge of oxidative enzymes *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 27, 105-98
  24. Beinert, H. (1976) Iron-sulfur proteins, the most numerous and most diversified components of the mitochondrial electron transfer system *Adv Exp Med Biol* 74, 137-49

- 
25. Beinert, H. Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises (2000) *J Biol Inorg Chem* 5(1), 2-15
  26. Beinert, H., Holm, R. H., and Munck, E. (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures *Science* 277(5326), 653-9
  27. Lode, E. T., and Coon, M. J. (1971) Enzymatic omega-oxidation. V. Forms of *Pseudomonas oleovorans* rubredoxin containing one or two iron atoms: structure and function in omega-hydroxylation *J Biol Chem* 246(3), 791-802
  28. Luchinat, C., Capozzi, F., Borsari, M., Battistuzzi, G., and Sola, M. (1994) Influence of surface charges on redox properties in high potential iron-sulfur proteins *Biochem Biophys Res Commun* 203(1), 436-42
  29. Schmidt, C. L., Anemuller, S., Teixeira, M., and Schafer, G. (1995) Purification and characterization of the Rieske iron-sulfur protein from the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius* *FEBS Lett* 359(2-3), 239-43
  30. Kuila, D., and Fee, J. A. (1986) Evidence for a redox-linked ionizable group associated with the [2Fe-2S] cluster of Thermus Rieske protein *J Biol Chem* 261(6), 2768-71
  31. Henninger, T., Anemuller, S., Fitz-Gibbon, S., Miller, J. H., Schafer, G., and Schmidt, C. L. (1999) A novel Rieske iron-sulfur protein from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*: sequencing of the gene, expression in *E. coli* and characterization of the protein *J Bioenerg Biomembr* 31(2), 119-28
  32. Soriano, G. M., Ponamarev, M. V., Carrell, C. J., Xia, D., Smith, J. L., and Cramer, W. A. (1999) Comparison of the cytochrome bc1 complex with the anticipated structure of the cytochrome b6f complex: Le plus ça change le plus c'est la même chose *J Bioenerg Biomembr* 31(3), 201-13
  33. Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L. S., and Crofts, A. R. (2000) Structure and function of cytochrome bc complexes *Annu Rev Biochem* 69, 1005-75
  34. Mason, J. R., and Cammack, R. (1992) The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases *Annu Rev Microbiol* 46, 277-305
  35. Link, T. A., Hatzfeld, O. M., Unalkat, P., Shergill, J. K., Cammack, R., and Mason, J. R. (1996) Comparison of the "Rieske" [2Fe-2S] center in the bc1 complex and in bacterial dioxygenases by circular dichroism spectroscopy and cyclic voltammetry *Biochemistry* 35(23), 7546-52
  36. Bartsch, R. G. (1991) The distribution of soluble metallo-redox proteins in purple phototrophic bacteria *Biochim Biophys Acta* 1058(1), 28-30

- 
37. Dus, K., De Klerk, H., Sletten, K., and Bartsch, R. G. (1967) Chemical characterization of high potential iron proteins from *Chromatium* and *Rhodopseudomonas gelatinosa* *Biochim Biophys Acta* 140(2), 291-311
  38. Meyer, T. E., Cannac, V., Fitch, J., Bartsch, R. G., Tollin, D., Tollin, G., and Cusanovich, M. A. (1990) Soluble cytochromes and ferredoxins from the marine purple phototrophic bacterium, *Rhodopseudomonas marina* *Biochim Biophys Acta* 1017(2), 125-38
  39. Evans, E. H., and Crofts, A. R. (1974) In situ characterisation of photosynthetic electron transport in *Rhodopseudomonas capsulata* *Biochim Biophys Acta* 357(1), 89-102
  40. Bartsch, R. G. (1978) Purification of (4Fe-4S)<sub>1-2</sub>-ferredoxins (high-potential iron-sulfur proteins) from bacteria *Methods Enzymol* 53, 329-40
  41. Flint, D. H., and Allen, R. M. (1996) Iron-Sulfur Proteins with Nonredox Functions *Chem Rev* 96, 2315-2334
  42. Johnson, M. K. (1998) Iron-sulfur proteins: new roles for old clusters *Curr Opin Chem Biol* 2(2), 173-81
  43. Johnson, M. K., Staples, C. R., Duin, E. C., Lafferty, M. E., and Duderstadt, R. E. (1998) Novel roles for Fe-S clusters in stabilizing or generating radical intermediates *Pure & Appl Chem* 70(4), 939-946
  44. Beinert, H., and Kennedy, M. C. (1989) 19th Sir Hans Krebs lecture. Engineering of protein bound iron-sulfur clusters. A tool for the study of protein and cluster chemistry and mechanism of iron-sulfur enzymes *Eur J Biochem* 186(1-2), 5-15
  45. Flint, D. H. (1993) *Escherichia coli* fumarase A catalyzes the isomerization of enol and keto oxalacetic acid *Biochemistry* 32(3), 799-805
  46. Hofmeister, A. E., Albracht, S. P., and Buckel, W. (1994) Iron-sulfur cluster-containing L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*: correlation of the cluster type with enzymatic activity *FEBS Lett.* 351(3), 416-418
  47. Kennedy, M. C., Emptage, M. H., Dreyer, J. L., and Beinert, H. (1983) The role of iron in the activation-inactivation of aconitase *J Biol Chem* 258(18), 11098-105
  48. Emptage, M. H., Dreyers, J. L., Kennedy, M. C., and Beinert, H. (1983) Optical and EPR characterization of different species of active and inactive aconitase *J. Biol. Chem.* 258(18), 11106-11111

- 
49. Khoroshilova, N., Popescu, C., Münck, E., Beinert, H., and Kiley, P. J. (1997) Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O<sub>2</sub>: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94(12), 6087-6092
  50. Popescu, C. V., Bates, D. M., Beinert, H., Münck, E., and Kiley, P. J. (1998) Mössbauer spectroscopy as a tool for the study of activation/inactivation of the transcription regulator FNR in whole cells of *Escherichia coli* *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95(23), 13431-13435
  51. Spiro, S., and Guest, J. R. (1990) FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli* *FEMS Microbiol Rev* 6(4), 399-428
  52. Guest, J. R. (1992) Oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. The 1992 Marjory Stephenson Prize Lecture *J Gen Microbiol* 138 ( Pt 11), 2253-63
  53. Beinert, H., and Kennedy, M. C. (1993) Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor *Faseb J.* 7(15), 1442-1449
  54. Paraskeva, E., and Hentze, M. W. (1996) Iron-sulphur clusters as genetic regulatory switches: the bifunctional iron regulatory protein-1 *FEBS Lett* 389(1), 40-3
  55. Ding, H., Hidalgo, E., and Dimple, B. (1996) The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor *J Biol Chem* 271(52), 33173-5
  56. Gaudu, P., and Weiss, B. (1996) SoxR, a [2Fe-2S] transcription factor, is active only in its oxidized form *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(19), 10094-8
  57. Ding, H., and Dimple, B. (2000) Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10), 5146-50
  58. Vollmer, S. J., Switzer, R. L., and Debrunner, P. G. (1983) Oxidation-reduction properties of the iron-sulfur cluster in *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase *J Biol Chem* 258(23), 14284-93
  59. Onate, Y. A., Vollmer, S. J., Switzer, R. L., and Johnson, M. K. (1989) Spectroscopic characterization of the iron-sulfur cluster in *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase *J. Biol. Chem.* 264(31), 18386-18391
  60. Switzer, R. L. (1989) Non-redox roles for iron-sulfur clusters in enzymes *Biofactors* 2(2), 77-86



- 
61. Cunningham, R. P., Asahara, H., Bank, J. F., Scholes, C. P., Salerno, J. C., Surerus, K., Munck, E., McCracken, J., Peisach, J., and Emptage, M. H. (1989) Endonuclease III is an iron-sulfur protein *Biochemistry* 28(10), 4450-5
  62. Kuo, C. F., McRee, D. E., Fisher, C. L., O'Handley, S. F., Cunningham, R. P., and Tainer, J. A. (1992) Atomic structure of the DNA repair [4Fe-4S] enzyme endonuclease III *Science* 258(5081), 434-40
  63. Fu, W., O'Handley, S., Cunningham, R. P., and Johnson, M. K. (1992) The role of the iron-sulfur cluster in *Escherichia coli* endonuclease III. A resonance Raman study *J Biol Chem* 267(23), 16135-7
  64. Staples, C. R., Ameyibor, E., Fu, W., Gardet-Salvi, L., Stritt-Etter, A. L., Schurmann, P., Knaff, D. B., and Johnson, M. K. (1996) The function and properties of the iron-sulfur center in spinach ferredoxin: thioredoxin reductase: a new biological role for iron- sulfur clusters *Biochemistry* 35(35), 11425-34
  65. Staples, C. R., Gaymard, E., Stritt-Etter, A. L., Telser, J., Hoffman, B. M., Schurmann, P., Knaff, D. B., and Johnson, M. K. (1998) Role of the [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>] cluster in mediating disulfide reduction in spinach ferredoxin:thioredoxin reductase *Biochemistry* 37(13), 4612-20
  66. Schindelin, H., Kisker, C., Schlessman, J. L., Howard, J. B., and Rees, D. C. (1997) Structure of ADP x AlF<sub>4</sub>(-)-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction *Nature* 387(6631), 370-376
  67. Rees, D. C., and Howard, J. B. (1999) Structural bioenergetics and energy transduction mechanisms *J Mol Biol* 293(2), 343-50
  68. Smith, B. E., Eady, R. R., Lowe, D. J., and Gormal, C. (1988) The vanadium-iron protein of vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum* contains an iron-vanadium cofactor *Biochem J* 250(1), 299-302
  69. Grossman, J. G., Hasnain, S. S., Yousafzai, F. K., Smith, B. E., and Eady, R. R. (1997) The first glimpse of a complex of nitrogenase component proteins by solution X-ray scattering: conformation of the electron transfer transition state complex of *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase *J Mol Biol* 266(4), 642-8
  70. Cammack, R. (1999) Hydrogenase sophistication [news] *Nature* 397(6716), 214-5
  71. Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (1995) Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* *Nature* 373(6515), 580-7

- 
72. Higuchi, Y., Yagi, T., and Yasuoka, N. (1997) Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis *Structure* 5(12), 1671-80
  73. Pierik, A. J., Roseboom, W., Happe, R. P., Bagley, K. A., and Albracht, S. P. (1999) Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)<sub>2</sub>CO, Biology's way to activate H<sub>2</sub> *J Biol Chem* 274(6), 3331-7
  74. Dobbek, H., Svetlitchnyi, V., Gremer, L., Huber, R., and Meyer, O. (2001) Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster *Science* 293(5533), 1281-5.
  75. Muller, F. (1983) The flavin redox-system and its biological function *Top Curr Chem* 108, 71-107
  76. Ghisla, S., and Massey, V. (1989) Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions *Eur J Biochem* 181(1), 1-17
  77. Ghisla, S., Kroneck, P., Macheroux, P., and Sund, H. (1999) *Flavins and Flavoproteins 1999*. Proceedings of the Thirteenth International Symposium (Ghisla, S., Kroneck, P., Macheroux, P., and Sund, H., Eds.), R. Weber: Agency for Scientific Publications, Konstanz, Germany
  78. Dym, O., and Eisenberg, D. (2001) Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins *Protein Sci* 10(9), 1712-28
  79. Edmondson, D. E., and Tollin, G. (1983) Semiquinone formation in flavo- and metalloflavoproteins *Top Curr Chem* 108, 109-38
  80. Steensma, E., Heering, H. A., Hagen, W. R., and Van Mierlo, C. P. (1996) Redox properties of wild-type, Cys69Ala, and Cys69Ser *Azotobacter vinelandii* flavodoxin II as measured by cyclic voltammetry and EPR spectroscopy *Eur J Biochem* 235(1-2), 167-72
  81. Byron, C. M., Stankovich, M. T., Husain, M., and Davidson, V. L. (1989) Unusual redox properties of electron-transfer flavoprotein from *Methylophilus methylotrophus* *Biochemistry* 28(21), 8582-7
  82. Simonsen, R. P., and Tollin, G. (1980) Structure-function relations in flavodoxins *Mol Cell Biochem* 33(1-2), 13-24
  83. Park, H. W., Kim, S. T., Sancar, A., and Deisenhofer, J. (1995) Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli* *Science* 268(5219), 1866-72
  84. Carell, T., Burgdorf, L. T., Kundu, L. M., and Cichon, M. (2001) The mechanism of action of DNA photolyases *Curr Opin Chem Biol* 5(5), 491-8

- 
85. Meighen, E. A. (1993) Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes *Faseb J* 7(11), 1016-22
  86. Briggs, W. R., Christie, J. M., and Salomon, M. (2001) Phototropins: a new family of flavin-binding blue light receptors in plants *Antioxid Redox Signal* 3(5), 775-88
  87. Todo, T. (2001) [DNA photolyase/cryptochrome protein family] *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 46(8 Suppl), 950-8
  88. Steenkamp, D. J., and Mallinson, J. (1976) Trimethylamine dehydrogenase from a methylotrophic bacterium. I. Isolation and steady-state kinetics *Biochim Biophys Acta* 429(3), 705-19
  89. Steenkamp, D. J., and Singer, T. P. (1978) Participation of the iron-sulphur cluster and of the covalently bound coenzyme of trimethylamine dehydrogenase in catalysis *Biochem J* 169(2), 361-9
  90. Stevenson, R. C., Dunham, W. R., Sands, R. H., Singer, T. P., and Beinert, H. (1986) Studies on the spin-spin interaction between flavin and iron-sulfur cluster in an iron-sulfur flavoprotein *Biochim Biophys Acta* 869(1), 81-8
  91. Scherf, U., Sohling, B., Gottschalk, G., Linder, D., and Buckel, W. (1994) Succinate-ethanol fermentation in *Clostridium kluyveri*: purification and characterisation of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase/vinylacetyl-CoA delta 3-delta 2-isomerase *Arch Microbiol* 161(3), 239-45
  92. Gerhardt, A., Çinkaya, I., Linder, D., Huisman, G., and Buckel, W. (2000) Fermentation of 4-aminobutyrate by *Clostridium aminobutyricum*: cloning of two genes involved in the formation and dehydration of 4-hydroxybutyryl-CoA *Arch Microbiol* 174(3), 189-99
  93. Klenk, H. P., Clayton, R. A., Tomb, J. F., White, O., Nelson, K. E., Ketchum, K. A., Dodson, R. J., Gwinn, M., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Richardson, D. L., Kerlavage, A. R., Graham, D. E., Kyrpides, N. C., Fleischmann, R. D., Quackenbush, J., Lee, N. H., Sutton, G. G., Gill, S., Kirkness, E. F., Dougherty, B. A., McKenney, K., Adams, M. D., Loftus, B., Venter, J. C., and et al. (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* [published erratum appears in Nature 1998 Jul 2;394(6688):101] *Nature* 390(6658), 364-70
  94. Woese, C. R., Gutell, R., Gupta, R., and Noller, H. F. (1983) Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids *Microbiol Rev* 47(4), 621-69

- 
95. Woese, C. R., Achenbach, L., Rouviere, P., and Mandelco, L. (1991) Archaeal phylogeny: reexamination of the phylogenetic position of *Archaeoglobus fulgidus* in light of certain composition-induced artifacts *Syst Appl Microbiol* 14(4), 364-71
  96. Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., and Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 [comment] [see comments] *Science* 277(5331), 1453-74
  97. Müh, U., Çinkaya, I., Albracht, S. P., and Buckel, W. (1996) 4-Hydroxybutyryl-CoA dehydratase from *Clostridium aminobutyricum*: characterization of FAD and iron-sulfur clusters involved in an overall non-redox reaction *Biochemistry* 35(36), 11710-11718
  98. Müh, U., Buckel, W., and Bill, E. (1997) Mossbauer study of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase--probing the role of an iron-sulfur cluster in an overall non-redox reaction *Eur J Biochem* 248(2), 380-4
  99. Engel, C. K., Mathieu, M., Zeelen, J. P., Hiltunen, J. K., and Wierenga, R. K. (1996) Crystal structure of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase at 2.5 angstroms resolution: a spiral fold defines the CoA-binding pocket *Embo J* 15(19), 5135-45
  100. Çinkaya, I. (1996) in Diplomarbeit, pp. 55, Marburg, Germany
  101. Buckel, W., and Liedtke, H. (1986) The sodium pump glutaconyl-CoA decarboxylase from *Acidaminococcus fermentans*. Specific cleavage by n-alkanols *Eur J Biochem* 156(2), 251-7
  102. Scherf, U., and Buckel, W. (1991) Purification and properties of 4-hydroxybutyrate coenzyme A transferase from *Clostridium aminobutyricum* *Appl Environ Microbiol* 57(9), 2699-702
  103. Janda, M., and Hemmerich, P. (1976) 5-Deaza- and 5-thiariboflavins: a simple pathway to antimetabolites of vitamin B2 *Angew Chem Int Ed Engl* 15(7), 443-4
  104. Hagen, W. R. (1989) Direct electron transfer of redox proteins at the bare glassy carbon electrode *Eur J Biochem* 182(3), 523-30
  105. Bennati, M., Farrar, C. T., Bryant, J. A., Inati, S. J., Weis, V., Gerfen, G. J., Riggs-Gelasco, P., Stubbe, J., and Griffin, R. G. (1999) Pulsed electron-nuclear double resonance (ENDOR) at 140 GHz *J Magn Reson* 138(2), 232-43.
  106. Hardman, H. K., and Stadtman, T. C. (1962) gamma-Hydroxybutyrate dehydrogenase from *Clostridium aminobutyricum* *Methods Enzymol* 5, 778-783

- 
107. Tonomura, B., Nakatani, H., Ohnishi, M., Yamaguchi-Ito, J., and Hiromi, K. (1978) Test reactions for a stopped-flow apparatus. Reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol and potassium ferricyanide by L-ascorbic acid *Anal Biochem* 84(2), 370-83
  108. Hiromi, K., Kuwamoto, C., and Ohnishi, M. (1980) A rapid sensitive method for the determination of ascorbic acid in the excess of 2,6-dichlorophenolindophenol using a stopped-flow apparatus *Anal Biochem* 101(2), 421-6
  109. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fuyimoto, E. K., Goetze, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid *Anal Biochem* 150, 76-85
  110. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 *Nature* 227, 680-685
  111. Whitby, L. G. (1953) *Biochem J* 54, 437-445
  112. Fish, W. W. (1988) Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples *Methods Enzymol.* 158, 661-668
  113. Pierik, A. J. (1993) Spectroscopic studies on iron sulfur proteins. Dissertation, Landwirtschaftliche Universität Wageningen, Niederlande
  114. Cline, J. D. (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters *Limnol. Oceanogr.* 14, 454-458
  115. Mayhew, S. G. (1978) The redox potential of dithionite and SO<sub>2</sub> from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase *Eur J Biochem* 85(2), 535-47
  116. Massey, V., and Hemmerich, P. (1978) Photoreduction of flavoproteins and other biological compounds catalyzed by deazaflavins *Biochemistry* 17(1), 9-16
  117. de Vries, S., and Albracht, S. P. (1979) Intensity of highly anisotropic low-spin heme EPR signals *Biochim Biophys Acta* 546(2), 334-40
  118. Beinert, H., and Albracht, S. P. (1982) New insights, ideas and unanswered questions concerning iron-sulfur clusters in mitochondria *Biochim Biophys Acta* 683(3-4), 245-77
  119. Aasa, R., and Vanngard, T. (1975) *J Magn Res* 19, 308-315
  120. Rupp, H., Rao, K. K., Hall, D. O., and Cammack, R. (1978) Electron spin relaxation of iron-sulphur proteins studied by microwave power saturation *Biochim Biophys Acta* 537(2), 255-60

- 
121. Wilson, D. F., Erecinska, M., Dutton, P. L., and Tsudzuki, T. (1970) The oxidation-reduction potentials of the iron-sulfur proteins in mitochondria *Biochem Biophys Res Commun* 41(5), 1273-8
  122. Heinze, J. (1984) Cyclovoltammetrie - Die "Spektroskopie" des Elektrochemikers *Angew Chem* 96(11), 823-916
  123. Simon, E. J., and Shemin, D. (1953) The preparation of S-succinyl coenzyme A *J Am Chem Soc* 75, 2520
  124. Ellmann, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl group *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77
  125. Abramovitz, A. S., and Massey, V. (1976) Interaction of phenols with old yellow enzyme. Physical evidence for charge-transfer complexes *J Biol Chem* 251(17), 5327-36
  126. Palmer, G., Müller, F., and Massey, V. (1971) in *Flavins and Flavoproteins* (Kamin, H., ed), pp. 123-137, University Park Press, Baltimore
  127. Medina, M., Gomez-Moreno, C., and Cammack, R. (1994) ESR and ENDOR characterization of flavodoxin from *Anabaena* sp. PCC 7119 *Biochem Soc Trans* 22(3), 371S
  128. Medina, M., Vrieling, A., and Cammack, R. (1994) ESR and electron nuclear double resonance characterization of the cholesterol oxidase from *Brevibacterium sterolicum* in its semiquinone state *Eur J Biochem* 222(3), 941-7
  129. Gayda, J. P., Gibson, J. F., Cammack, R., Hall, D. O., and Mullinger, R. (1976) Spin lattice relaxation and exchange interaction in a 2-iron, 2-sulphur protein *Biochim Biophys Acta* 434(1), 154-63
  130. Spiro, S. et al. (Iron-Sulfur Proteins)
  131. Fersht. (1999) *Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding* (M.R., J., Ed.), Freeman, New York
  132. Rudik, I., Ghisla, S., and Thorpe, C. (1998) Protonic equilibria in the reductive half-reaction of the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase *Biochemistry* 37(23), 8437-45
  133. Gurtoo, H. L., and Johns, D. G. (1971) On the interaction of the electron acceptor 2,6-dichlorophenolindophenol with bovine milk xanthine oxidase *J Biol Chem* 246(2), 286-93
  134. Eriksson, L. E., and Ehrenberg, A. (1973) On the powder ESR and ENDOR spectra of flavoprotein radicals *Biochim Biophys Acta* 295(1), 57-66
  135. Kurreck, H., Bock, M., Bretz, M., Elsner, M., Kraus, G., Lubitz, W., Müller, W., Geissler, H., and Kroneck, P. M. H. (1984) Fluid solution and solid-state

- electron nuclear double resonance studies of flavin model compounds and flavoenzymes. *J Am Chem Soc* 106, 737-746
136. Edmondson, D. E. (1985) Electron-spin-resonance studies on flavoenzymes *Biochem Soc Trans* 13(3), 593-600
137. Kent, T. A., Emptage, M. H., Merkle, H., Kennedy, M. C., Beinert, H., and Munck, E. (1985) Mossbauer studies of aconitase. Substrate and inhibitor binding, reaction intermediates, and hyperfine interactions of reduced 3Fe and 4Fe clusters *J Biol Chem* 260(11), 6871-81
138. Stephens, P. J., Thomson, A. J., Dunn, J. B., Keiderling, T. A., Rawlings, J., Rao, K. K., and Hall, D. O. (1978) Circular dichroism and magnetic circular dichroism of iron-sulfur proteins *Biochemistry* 17(22), 4770-8
139. Kay, C. J., Barber, M. J., and Solomonson, L. P. (1988) Circular dichroism and potentiometry of FAD, heme and Mo-pterin prosthetic groups of assimilatory nitrate reductase *Biochemistry* 27(16), 6142-9
140. Fritz, G., Buchert, T., Huber, H., Stetter, K. O., and Kroneck, P. M. (2000) Adenylylsulfate reductases from archaea and bacteria are 1:1 alphabeta-heterodimeric iron-sulfur flavoenzymes--high similarity of molecular properties emphasizes their central role in sulfur metabolism *FEBS Lett* 473(1), 63-6
141. Komai, H., Massey, V., and Palmer, G. (1969) The preparation and properties of deflavo xanthine oxidase *J Biol Chem* 244(7), 1692-700
142. Ryle, M. J., Lanzilotta, W. N., Seefeldt, L. C., Scarrow, R. C., and Jensen, G. M. (1996) Circular dichroism and x-ray spectroscopies of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase iron protein. MgATP and MgADP induced protein conformational changes affecting the [4Fe-4S] cluster and characterization of a [2Fe-2S] form *J Biol Chem* 271(3), 1551-7
143. Duin, E. C., Lafferty, M. E., Crouse, B. R., Allen, R. M., Sanyal, I., Flint, D. H., and Johnson, M. K. (1997) [2Fe-2S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Escherichia coli* biotin synthase *Biochemistry* 36(39), 11811-11820
144. Hans, M., Buckel, W., and Bill, E. (2000) The iron-sulfur clusters in 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. Biochemical and spectroscopic investigations *Eur J Biochem* 267(24), 7082-93
145. Locher, K. P., Hans, M., Yeh, A. P., Schmid, B., Buckel, W., and Rees, D. C. (2001) Crystal structure of the *Acidaminococcus fermentans* 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase component A *J Mol Biol* 307(1), 297-308

- 
146. Lloyd, S. J., Lauble, H., Prasad, G. S., and Stout, C. D. (1999) The mechanism of aconitase: 1.8 Å resolution crystal structure of the S642A: citrate complex *Protein Sci* 8(12), 2655-62
  147. Çinkaya, I., Buckel, W., Medina, M., Gomez-Moreno, C., and Cammack, R. (1997) Electron-nuclear double resonance spectroscopy investigation of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase from *Clostridium aminobutyricum*: comparison with other flavin radical enzymes *Biol Chem* 378(8), 843-9
  148. Orme-Johnson, W. H. (1973) Iron-sulfur proteins: structure and function *Annu Rev Biochem* 42(0), 159-204
  149. Poe, M., Phillips, W. D., McDonald, C. C., and Lovenberg, W. (1970) Proton magnetic resonance study of ferredoxin from *Clostridium pasteurianum* *Proc Natl Acad Sci U S A* 65(4), 797-804
  150. Bertini, I., Capozzi, F., Luchinat, C., Piccioli, M., and Vila, A. J. (1994) The Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>-centers in ferredoxins studied through proton and carbon hyperfine coupling - Sequence-specific assignments of cysteins in ferredoxins from *Clostridium acidii-urici* and *Clostridium pasteurianum*. *J Am Chem Soc* 116, 651-660
  151. Massey, V., Palmer, G., Williams, S. H. J., Swoboda, W. E. P., and Sands, R. H. (1965)
  152. Grandoni, J. A., Switzer, R. L., Makaroff, C. A., and Zalkin, H. (1989) Evidence that the iron-sulfur cluster of *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase determines stability of the enzyme to degradation in vivo *J Biol Chem* 264(11), 6058-64
  153. Albracht, S. P. (1980) The prosthetic groups in succinate dehydrogenase. Number and stoichiometry *Biochim Biophys Acta* 612(1), 11-28
  154. Bonomi, F., Pagani, S., Cerletti, P., and Giori, C. (1983) Modification of the thermodynamic properties of the electron-transferring groups in mitochondrial succinate dehydrogenase upon binding of succinate *Eur J Biochem* 134(3), 439-45
  155. Ravasio, S., Curti, B., and Vanoni, M. A. (2001) Determination of the midpoint potential of the FAD and FMN flavin cofactors and of the 3Fe-4S cluster of glutamate synthase *Biochemistry* 40(18), 5533-41
  156. O'Farrell, P. A., Walsh, M. A., McCarthy, A. A., Higgins, T. M., Voordouw, G., and Mayhew, S. G. (1998) Modulation of the redox potentials of FMN in *Desulfovibrio vulgaris* flavodoxin: thermodynamic properties and crystal structures of glycine-61 mutants *Biochemistry* 37(23), 8405-16



- 
157. Bradley, L. H., and Swenson, R. P. (2001) Role of hydrogen bonding interactions to N(3)H of the flavin mononucleotide cofactor in the modulation of the redox potentials of the *Clostridium beijerinckii* flavodoxin *Biochemistry* 40(30), 8686-95
  158. Jang, S. B., Seefeldt, L. C., and Peters, J. W. (2000) Modulating the midpoint potential of the [4Fe-4S] cluster of the nitrogenase Fe protein *Biochemistry* 39(4), 641-8
  159. Mathews, R., Charlton, S., Sands, R. H., and Palmer, G. (1974) On the nature of the spin coupling between the iron-sulfur clusters in the eight-iron ferredoxins *J Biol Chem* 249(13), 4326-8
  160. Bellamy, H. D., Lim, L. W., Mathews, F. S., and Dunham, W. R. (1989) Studies of crystalline trimethylamine dehydrogenase in three oxidation states and in the presence of substrate and inhibitor *J Biol Chem* 264(20), 11887-92
  161. Correll, C. C., Batie, C. J., Ballou, D. P., and Ludwig, M. L. (1992) Phthalate dioxygenase reductase: a modular structure for electron transfer from pyridine nucleotides to [2Fe-2S] *Science* 258(5088), 1604-10
  162. Correll, C. C., Ludwig, M. L., Bruns, C. M., and Karplus, P. A. (1993) Structural prototypes for an extended family of flavoprotein reductases: comparison of phthalate dioxygenase reductase with ferredoxin reductase and ferredoxin *Protein Sci* 2(12), 2112-33
  163. Kuchta, R. D., Hanson, G. R., Holmquist, B., and Abeles, R. H. (1986) Fe-S centers in lactyl-CoA dehydratase *Biochemistry* 25(23), 7301-7307

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Buckel für die interessante Themenstellung und seine ständige Diskussionsbereitschaft. Ich danke für die Freiheit zum selbständigen Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. R. K. Thauer danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit als Zweitgutachter zu betreuen sowie für die uneingeschränkte Möglichkeit das EPR-Gerät im MPI zu nutzen.

Herrn Prof. Dr. R. Cammack (King's College London) danke ich für die Möglichkeit zu einem Forschungsaufenthalt und sein Interesse an der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase.

Herrn PD Dr. T.A. Link (Universität Frankfurt, Institut für Biophysik) und Herrn Dr. Eckhard Bill (Max-Planck-Institut für Strahlenchemie, Mülheim) danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit und ihr großes Interesse an dieser Arbeit.

Der Arbeitsgruppe Buckel sowie den benachbarten Arbeitsgruppen Thauer, Bremer und Völker danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Herrn Dr. A. J. Pierik sei für die zahlreichen Hilfestellungen gedankt.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Substrat induzierte Radikalbildung in dem Eisen-Schwefel-Flavoenzym  
4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium aminobutyricum*

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen  
als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei  
keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen  
Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 03.06.2002

Irfan Çinkaya

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)